



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR  
SETOR DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

**LARISSA ALBUNIO SILVA**

**ESTUDO DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E  
RECUPERAÇÃO DO PIGMENTO FICOCIANINA DA *SPIRULINA PLATENSIS*.**

CURITIBA  
2008

**LARISSA ALBUNIO SILVA**

**ESTUDO DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E  
RECUPERAÇÃO DO PIGMENTO FICOCIANINA DA *SPIRULINA PLATENSIS*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração Agroindústria, Departamento de Engenharia Química, Setor de Engenharia/Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Julio César de Carvalho  
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA  
2008

## **AGRADECIMENTOS**

Em meio às várias pessoas que me ajudaram no decorrer desses anos, gostaria de agradecer em especial,

Ao meu orientador, o Professor Dr. Júlio César de Carvalho, a dedicação, apoio e amizade desde o início. Esse trabalho deve muito às sugestões de encaminhamentos teóricos e práticos, às nossas reuniões de trabalho, e às inúmeras revisões de texto;

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela co-orientação e pelo meu acolhimento no Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos;

Às Professoras Drs. Adriana Bianchi Pedroni Medeiros, Luciana Porto de Souza Vandenberghe e Adenise Lorenci Woiciechowski pelo auxílio no decorrer do curso;

À todos os meus colegas de pós-graduação principalmente os meus amigos Vanessa, Joana, Marisa, Luis Letti, Jefferson, Camila Suarez, Patrícia, Susan, Luciana, Caroline Tiemi, pela amizade, companheirismo e trabalho em equipe;

Aos meus pais Hilda e Luiz e minha irmã Letícia por sempre acreditarem na minha capacidade, por me incentivarem a concluir este trabalho e pela força que me deram nos momentos mais difíceis, sei que com vocês sou mais forte;

Em particular ao Alysson pela dedicação, paciência, companheirismo e por me passar muita confiança, amor e carinho;

Finalmente a todos que colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

## RESUMO

A microalga *Spirulina platensis* tem sido amplamente estudada, pois apresenta altas quantidades de proteína e também biopigmentos. É considerada uma fonte potencial do pigmento-proteína ficocianina, que por sua vez, possui propriedades funcionais, como antioxidante e antiinflamatória, e por ser um corante pode ser utilizado na indústria de alimentos agregando cor e valor nutricional.

De forma a levantar dados importantes para a produção industrial de ficocianina, estudou-se a cinética de crescimento da microalga, como também métodos de extração otimizando a recuperação da ficocianina e purificação por precipitação, de forma a obter pureza aceitável na aplicação em alimentos. A concentração de ficocianina na microalga ao longo do tempo de cultivo, os efeitos dos diferentes métodos de rompimento celular e de pHs do solvente envolvido foram investigados, além da precipitação do pigmento em diferentes concentrações de sal para a purificação.

A maior quantidade de ficocianina obtida nas culturas coincidiu com a máxima concentração celular alcançada em 15 dias de cultivo. O rompimento celular mecânico não gerou resultados satisfatórios para produção de ficocianina, comparado ao método de congelamento/descongelamento em sucessivos ciclos que resultou em concentração de ficocianina de 126 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca. A purificação através da precipitação por fracionamento com diferentes concentrações de sal [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] resultou em concentração de ficocianina de 30,67 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca e taxa de pureza (Abs<sub>620</sub>/Abs<sub>280</sub>) igual a 2, nível satisfatório para aplicação em alimentos.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*. Ficocianina. Rompimento celular.

## ABSTRACT

The microalga *Spirulina platensis* has been widely studied in the recent decades, because it presents high amounts of protein and biopigments. It is considered a potential source of the protein pigment *phycocyanin*, which in turn, has functional properties, such as antioxidant and anti-inflammatory, and as a dye it may be used in food industry adding color and nutritional value.

In order to uncover useful data for the industrial production of phycocyanin, the growth of the microalga was studied, as well as methods of extraction – optimizing the recovery of phycocyanin and purification by precipitation, in order to obtain acceptable purity for use in foods. The concentration of phycocyanin in the microalga along the cultivation, the effects of different methods of cell disruption and pH of the solvent used were investigated, as well as the precipitation of pigment in different concentrations of salt for purification.

The highest amount of phycocyanin obtained in the cultures coincided with the highest biomass concentration reached in 15 days of culture. The mechanical cell disruption was ineffective for phycocyanin production, as compared to freezing/thawing in successive cycles that resulted in phycocyanin concentration of 126 mg.g<sup>-1</sup> dry biomass. The purification through precipitation by fractionation at different salt concentrations [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] resulted in a concentration of phycocyanin of 30,67 mg.g<sup>-1</sup> dry biomass and purification rate (Abs<sub>620</sub>/Abs<sub>280</sub>) equals to 2, level adequate for use in food.

**Keywords:** *Spirulina platensis*. Phycocyanin. Cell disruption.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do pigmento ficocianobilina.....	15
Figura 2 - Exemplos de formas comerciais de <i>Spirulina</i> .....	20
Figura 3 - Gênero <i>Spirulina</i> , vista no microscópio (40x).....	22
Figura 4 - Modelo estrutural de ficobilissomos de <i>Spirulina platensis</i> .....	24
Figura 5 - Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> em larga escala em vias fluviais.....	28
Figura 6 - Fotobiorreatores utilizados para cultivo de <i>Spirulina platensis</i> .....	39
Figura 7 - Fluxograma dos métodos de extração e recuperação de ficocianina da microalga <i>Spirulina platensis</i> .....	42
Figura 8 - Fluxograma dos passos de extração e recuperação de ficocianina.....	44
Figura 9 - Cinética de crescimento de <i>Spirulina platensis paracas</i> em meio Zarrouk.....	47
Figura 10 - Curvas de velocidade específica e crescimento logarítmico.....	48
Figura 11 - Concentração celular e de ficocianina como função do tempo de cultivo.....	50
Figura 12 - Testes de precipitação sem tratamento e com ajuste de pHs, observado após 24 h e 168 h.....	52
Figura 13 - Testes de precipitação com tratamento em diferentes concentrações de sal Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , observado após 48 h.....	53
Figura 14 - Crescimento da <i>Spirulina platensis</i> em meio sólido, inoculada por estrias.....	55
Figura 15 - Curva de ficocianina de <i>Spirulina platensis</i> obtida por congelamento/ descongelamento no total de 8 ciclos.....	57
Figura 16 – Ficocianina (mg.g <sup>-1</sup> biomassa seca) em função da pressão exercida no <i>French press</i> .....	60
Figura 17 – Ficocianina (mg.g <sup>-1</sup> biomassa seca) em função da pressão exercida no homogeneizador de alta pressão. ....	61
Figura 18 - Células de <i>Spirulina platensis</i> , vistas ao microscópio, rompidas pelo homogeneizador nas pressões: 30, 50, 120 e 250 atm.....	62
Figura 19 - Curvas de ficocianina no sobrenadante e ficocianina no precipitado ressuspendido em função de diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CORANTES NATURAIS, SINTÉTICOS, SINTÉTICOS IDÊNTICOS AOS NATURAIS E CORANTES ORGÂNICOS PERMITIDOS NO BRASIL.....	13
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES GERAIS ENTRE ALGUNS ALIMENTOS E MICROALGAS.....	18
TABELA 3 - PRODUÇÃO ATUAL DE MICROALGAS NO MUNDO.....	26
TABELA 4 - SAIS E SOLUÇÕES DO MEIO ZARROUK (1966).....	29
TABELA 5 - QUANTIDADES DOS MACRONUTRIENTES DO MEIO ZARROUK.....	37
TABELA 6 - QUANTIDADES DOS MICRONUTRIENTES DO MEIO ZARROUK.....	38
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DE FICOCIANINA OBTIDAS POR: <i>FRENCH PRESS</i> , HOMOGENEIZAÇÃO POR PRESSÃO E CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO.....	64





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	9
<b>1.1 OBJETIVO GERAL</b>	10
<b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	11
<b>2.1 CORANTES ARTIFICIAIS E NATURAIS</b>	11
<b>2.2 BIOPIGMENTOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO</b>	14
<b>2.3 MICRORGANISMOS</b>	16
2.3.1 Composição Química	18
2.3.2 Aplicações de Microalgas	19
<b>2.4 MICRORGANISMOS ESPECÍFICOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS</b>	21
<b>2.5 FICOCIANINA</b>	23
<b>2.6 PRODUÇÃO DE MICROALGAS</b>	26
2.6.1 Cultivo de microalgas	27
2.6.2 Meios de Cultivo para Microalgas	28
2.6.3 Nutrição para Cultivo de Microalgas	29
2.6.4 Condições de Cultivo de Microalgas	31
<b>2.7 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS</b>	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
<b>3.1 MICRORGANISMO</b>	37
<b>3.2 MEIOS DE CULTIVO</b>	37
3.2.1 Meio de cultivo para <i>Spirulina platensis paracas</i>	37
<b>3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO</b>	38
<b>3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	47
<b>4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO ASSOCIADA À EXTRAÇÃO E PRODUÇÃO DE FICOCIANINA</b>	47
<b>4.2 PRECIPITAÇÃO DE BIOMASSA</b>	51
<b>4.3 ISOLAMENTO DA MICROALGA <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> E TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS</b>	54
<b>4.4 EXTRAÇÃO DE FICOCIANINA</b>	56
4.4.1 Extração por Congelamento / Descongelamento	57
4.4.2 Extração Mecânica	59
<b>4.5 PURIFICAÇÃO</b>	65
<b>5 CONCLUSÕES</b>	69
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	70
<b>REFERÊNCIAS</b>	71
<b>ANEXOS</b>	83



## 1INTRODUÇÃO

A aceitação de um produto alimentício pelo consumidor está diretamente relacionada à sua cor. Por essa razão, o setor alimentício preocupa-se tanto com a aplicação de cores e obtenção de alimentos que agradem aos olhos do consumidor.

Os egípcios já coloriam alimentos há pelo menos 3.500 anos. Ao final do século XIX, o desenvolvimento da indústria de alimentos, levou à produção de numerosos corantes sintéticos, os quais chegaram a totalizar 700, onde a grande maioria era tóxica. Com a necessidade de substituir vários corantes artificiais ou sintéticos, a indústria de alimentos recorreu a uma série de pigmentos naturais. Estes pigmentos podem ser encontrados em vários microrganismos, como as microalgas.

As vantagens da produção de pigmentos por microalgas, em relação aos similares de vegetais e animais, são: o cultivo contínuo e a rápida multiplicação desses microrganismos. Em relação à produção de pigmentos por microalgas, são encontradas citações relatando que podem existir milhões de representantes deste grupo, que podem produzir pigmentos de interesse. Portanto, a exploração de pigmentos naturais pode aumentar muito e o mercado destes corantes cresce a uma velocidade de 5 a 10% ao ano.

Um exemplo de microalga que produz pigmentos importantes é a *Spirulina platensis*, com custos de produção em torno de US\$ 8-15 por kg de massa seca. Os produtos dessa microalga, como as ficobiliproteínas, possuem preços que variam de US\$ 3-US\$ 25/mg para o pigmento bruto, a US\$ 1500/mg para o pigmento purificado.

O potencial primário das ficobiliproteínas parece ser o de corantes naturais, mas o crescente número de investigações tem mostrado suas propriedades na saúde, isto é, aplicações farmacêuticas. O pigmento ou o cromóforo mais abundante e importante das ficobiliproteínas é a ficocianina. Assim, a primeira e mais importante aplicação da mesma é como pigmento de alimento, substituindo pigmentos sintéticos.

A proposta deste trabalho é obter a ficocianina biotecnologicamente, aperfeiçoando alguns métodos de extração já utilizados, visando ampliar as opções do mercado de alimentos com a possibilidade de sua utilização como corante alimentício de origem natural.

**1.1OBJETIVO GERAL:** Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina, a partir da microalga *Spirulina platensis*, para possíveis aplicações em alimentos.

## **1.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1)**Estudar a cinética de produção da microalga *Spirulina platensis*, relacionando-a com o biopigmento ficocianina.
- 2)**Avaliar os métodos de extração do pigmento ficocianina.
- 3)**Otimizar as variáveis de extração.
- 4)**Avaliar a purificação de ficocianina para aplicação em alimentos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CORANTES ARTIFICIAIS E NATURAIS

Muitos dos alimentos consumidos atualmente contêm aditivos, a maioria de origem sintética. Estes aditivos podem ser corantes, antioxidantes, conservantes, emulsificantes, estabilizadores e outros aditivos como realçadores de sabor e agentes antiespumantes.

Segundo o Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961, consideram-se aditivos para alimentos as substâncias ou misturas de substâncias, dotadas ou não de poder alimentício, adicionadas aos alimentos com a finalidade de lhes conferir ou intensificar o aroma, a cor, o sabor ou modificar seu aspecto físico geral, ou ainda prevenir alterações indesejáveis (BRASIL, 2008a). Excluem-se ainda da definição posterior, os sucos e/ou os extratos de vegetais e outros ingredientes utilizados na elaboração de alimentos (e bebidas) que possuem coloração própria, salvo se adicionados com a finalidade de conferir ou intensificar a coloração própria do produto (BRASIL, 2008b).

Neste sentido, corantes são aditivos alimentares definidos como “toda substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir, intensificar ou restaurar a cor de um alimento e/ou bebida” (BRASIL, 2008b). Conforme BRASIL (2008a) considera-se corante natural, o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. Já o corante artificial é a substância obtida por processo de síntese (com composição química definida).

Em se tratando de corantes ou pigmentos alimentares, estes são classificados como (BRASIL, 2008b):

- Corante orgânico natural - aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante orgânico sintético - aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante artificial - é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.

- Corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
- Corante inorgânico - aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.
- Caramelo - o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
- Caramelo (processo amônia) - é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200 mg/kg (duzentos miligramas por quilo).

O debate em torno do uso desses aditivos concentra-se, sobretudo, nos corantes sintéticos, atualmente mais usados pela indústria alimentícia. São inegáveis as vantagens da aplicação dos corantes artificiais em alimentos, já que a maioria apresenta alta estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo. Apesar dessas vantagens o que se constata é que o número de aditivos sintéticos permitidos nos países desenvolvidos vem diminuindo a cada ano (CONSTANT *et al.*, 2002).

A substituição por corantes naturais (que compreendem desde partes comestíveis e sucos de vegetais, animais e insetos até substâncias naturais extraídas e purificadas) tem sido gradativa (PIMENTEL, 1995; CARVALHO, 1992, apud CONSTANT *et al.*, 2002).

No momento, a legislação brasileira, atualizada com boa parte das leis internacionais e seguindo as recomendações multilaterais da FAO (Food and Agriculture Organization), permite apenas oito corantes sintéticos e mais seis sintéticos idênticos aos naturais (Tabela 1). A permissão depende da indicação nos rótulos sobre a sua condição sintética e sobre a ingestão diária aceitável (FURTADO, 2006).

TABELA 1 - CORANTES NATURAIS, SINTÉTICOS, SINTÉTICOS IDÊNTICOS AOS NATURAIS E CORANTES INORGÂNICOS PERMITIDOS NO BRASIL

Corante orgânico natural	Corante orgânico sintético artificial	Corante orgânico sintético idêntico ao natural	Corante inorgânico (pigmentos) (emprego limitado à superfície)
Curcumina	Amarelo crepúsculo	Beta-caroteno	Carbonato de cálcio
Riboflavina	Indigotina	Beta-Apo-8'-carotenal	Dióxido de Titânio
Cochonilha; ácido carmínico	Bodeaux S ou amaranto	Éster etílico do ácido beta-Apo-8' carotênico	Óxido e hidróxido de ferro
Urzela; orceína, orecína sulfonada	Tartrazina	Cantaxanteno	Alumínio
Clorofila	Azul brilhante FCF	Complexo cúprico da clorofila e clorofilina	Prata
Caramelo	Eritrosina	Caramelo amônia	Ouro
Carvão medicinal	Ponceau 4 R	—	—
Alguns carotenóides	Vermelho 40	—	—
Algumas xantofilas	—	—	—
Vermelho de beterraba, betanina	—	—	—
Algumas antocianinas	—	—	—

FONTE: BRASIL (2008b)

O fato de esses corantes sintéticos serem permitidos, porém, não anula seus efeitos adversos, que embora não sejam divulgados na embalagem estão disponíveis em artigos científicos. Por exemplo, a eritrosina, corante sintético vermelho, consta como causadora de hipertireoidismo quando consumida em excesso. Também o vermelho Ponceau pode causar anemia e uma doença renal (glomerulonefrite), enquanto o amarelo tartrazina recentemente foi associado como causa de insônia em crianças (FURTADO, 2006).

Embora também apresentem desvantagens, como a baixa estabilidade, solubilidade e quase sempre o alto custo no processo, os corantes naturais têm sido utilizados há anos sem evidências de danos à saúde. Alguns apresentam solubilidade

em óleo, proporcionam matizes suaves e conferem ao produto aspecto natural, o que aumenta a aceitação pelo consumidor (CONSTANT *et al.*, 2002).

Para aumentar a estabilidade de pigmentos naturais e idênticos aos naturais, como também a variação desta estabilidade e solubilidade, são usados aditivos em formulações destes corantes como: dispersantes, antioxidantes, sequestrantes, etc. No processo tecnológico o que se desenvolve atualmente são alguns microencapsulantes de pigmentos naturais, por exemplo, para aumentar a estabilidade de pigmentos carotenóides. E tanto para pigmentos sintéticos quanto naturais, são desenvolvidos processos para transformar corantes em pó em granulares, aumentando a área superficial e facilitando a dissolução (DOWNHAM e COLLINS, 2000).

Em se tratando de corantes naturais, estes podem ser divididos em três grupos principais: os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica, que compreendem as clorofilas presentes em vegetais e microrganismos, o heme e as bilinas encontradas em animais; os compostos de estrutura isoprenóide, representados pelos carotenóides, encontrados em animais, vegetais como também em microrganismos e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio como os flavonóides, que são encontrados em vegetais e microrganismos. Além desses existem outros dois grupos de corantes presentes unicamente em vegetais: as betalainas que são compostos nitrogenados e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis (CONSTANT *et al.*, 2002).

A substituição dos pigmentos sintéticos, usados em alimentos, por pigmentos naturais será um importante passo para produzir alimentos mais saudáveis, pois além da capacidade de dar cor muitos possuem propriedades funcionais e/ou terapêuticas (DERNER, 2006).

## 2.2BIOPIGMENTOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO

Há um crescente interesse na área da biotecnologia para a obtenção de fontes não vegetais de corantes. Dessa forma, pigmentos naturais de origem microbiana são uma classe de pigmentos que apresentam vantagem em termos de produção em relação aos seus similares extraídos de vegetais ou animais. O uso da produção de



pigmentos por bioprocessos envolvendo microrganismos apresenta vantagens como: cultivo contínuo e rápida multiplicação desses microrganismos, que pode garantir uma produtividade tal para o processo que o torna vantajoso (JACOBSON, 1998; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

Pigmentos naturais produzidos por bioprocessos envolvem invariavelmente o cultivo de microrganismos (bactérias, fungos, microalgas) e etapas posteriores como secagem e eventual extração e purificação. Exemplos da produção de biopigmentos por microalgas e cianobactérias são o  $\beta$ - caroteno, a astaxantina e as ficobiliproteínas.

O principal microrganismo usado na produção comercial de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) é a microalga *Spirulina* (ou *Arthrospira*, cianobactéria azul-verde). O potencial primário dessas moléculas parece ser o de corantes naturais, mas o crescente número de investigações tem mostrado suas propriedades na saúde, isto é, aplicações farmacêuticas. Assim, a primeira e mais importante aplicação da ficocianina é como pigmento de alimentos, substituindo pigmentos sintéticos e, seu cromóforo chamado ficocianobilina, encontra-se ilustrado na Figura 1(BECKER, 2004).

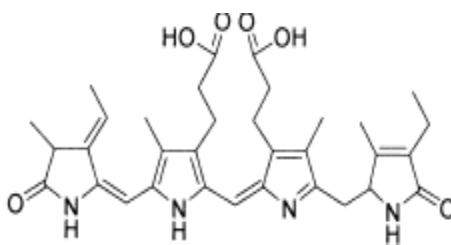


Figura 1 - Estrutura química do pigmento ficocianobilina.  
FONTE: Adaptado de SPOLAORE *et al.* (2006)

Grandes indústrias como a Dainippon Tintas & Produtos químicos (Sakura) desenvolveram um produto chamado Linha azul que é usado em: gomas, sorvetes, doces, bebidas, etc e também vendem outra forma deste pigmento em cosméticos naturais como batons e sombras de olho. As ficobiliproteínas são extensamente usadas na indústria e laboratórios imunológicos, devido às suas propriedades: altos

coeficientes de absorbância, alta produção de fluorescência, fotoestabilidade, etc (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Os custos de produção da microalga *Spirulina platensis* gira em torno de US \$ 8-15 por kg de massa seca. Esses custos são altos quando comparados, por exemplo, com farinha de peixe e soja, em torno de US\$ 1 por kg. Desta maneira se faz necessária a otimização da produção industrial em tanques abertos, que possuem vantagens como o pequeno investimento de capital e a utilização livre de fonte de energia, irradiação solar (JIMÉNEZ, COSSÍO e NIELL, 2003; LEE, 2001). Os produtos dessa microalga, como as ficobiliproteínas, possuem preços que variam de US \$ 3 - US\$ 25/mg para o pigmento bruto, a US\$ 1500/mg para o pigmento purificado (moléculas fluorescentes) (SPOLAORE *et al.*, 2006).

## 2.3MICRORGANISMOS

O crescente interesse no estudo de microrganismos como microalgas, alguns fungos, leveduras e bactérias deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica dentre outras (DERNER, 2006).

Nesse sentido, o uso de microalgas é capital na biotecnologia, uma vez que estas apresentam um metabolismo muito ativo e podem crescer sob condições simples e de baixo custo. O futuro do processo produtivo por meio do uso de microrganismos e de engenharia genética (tecnologia do DNA recombinante, engenharia metabólica, etc.) é praticamente ilimitado. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fontes de uma quantidade ilimitada de produtos como ácidos graxos poliinsaturados, corantes, enzimas, etc (DERNER, 2006).

O termo microalga não tem valor taxonômico, engloba microrganismos algais com clorofila-a e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica e, sua caracterização (sistemática) implica na consideração de

uma série de critérios (HOEK, MANN e JAHNS, 1995; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001).

Ainda sob a denominação *microalgas* estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: procariontes e eucariontes. Cianobactérias consistem em um grupo amplo e muito diverso de organismos procariontes fotossintéticos. Muitas espécies de microalgas e cianobactérias podem ser estimuladas a acumular diferentes tipos de reservas que podem ser usadas como pigmentos, fonte de lipídios, vitaminas e/ou proteínas (OLVERA-RAMÍREZ *et al.*, 2000).

A utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, tendo sido usadas como fonte de proteínas por tribos indígenas como os Astecas, que as secavam em camadas finas para serem consumidas. Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de 30 a 50 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> em massa seca. Esta característica, aliada à simplicidade nas técnicas de cultivo, torna as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação (GOLDMAN, 1980; NAVALHO, 1998; DERNER, 2006).

Historicamente, pessoas que viveram no Lago Chad na África e os astecas no Lago Texcoco no México, cultivavam *Spirulina platensis* nas águas desses lagos e usavam-na como alimento depois de seca (PIÑERO ESTRADA *et al.*, 2001; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Em 1980, haviam 46 fábricas em larga escala na Ásia produzindo mais de 100 kg de microalga (principalmente *Chlorella*) por mês. A produção da cianobactéria em larga escala começou na Índia ao mesmo tempo. Mais recentemente, várias plantas produzindo *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina, foram estabelecidas nos EUA e na Índia. Assim, em um curto período de 30 anos, a indústria de biotecnologia de microalgas adquiriu crescente e significativa diversidade. Nos dias atuais, são produzidos 5 t de biomassa seca/mês com valor de US\$ 100-150/kg, gerando aproximadamente US\$ 8 bilhões/ano (não estando incluídos os produtos de extração e purificação) (OLAIZOLA, 2003; PULZ e GROSS, 2004).

### 2.3.1 Composição Química

Como as microalgas constituem um grupo extremamente diverso de organismos, esta diversidade também se reflete na sua composição bioquímica e, assim como os fatores tanto biológicos quanto químicos influenciam o crescimento das microalgas, a composição bioquímica pode ser alterada significativamente pelas condições de cultivo.

Neste sentido, as composições das microalgas dão uma qualidade interessante às mesmas, que podem ser aplicadas à nutrição humana e animal, em cosméticos, produtos farmacêuticos, bem como terapêuticos, antioxidante e antiinflamatório (ROMAY *et al.*, 2003; BENEDETTI *et al.*, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006) e efeito anticancerígeno (PARDHASARAGHI *et al.*, 2003; SUBHASHINI *et al.*, 2004, apud MADHYASTHA *et al.*, 2005).

A Tabela 2 seguinte apresenta alguns destes compostos encontrados em microalgas comparando com alimentos.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES GERAIS ENTRE ALGUNS ALIMENTOS E MICROALGAS

Alimentos / microalgas	Proteína (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
Levedura	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Grão de feijão	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas rheinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14

<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

FONTE: BECKER (1994)

Verifica-se pela Tabela 2 a elevada quantidade de proteína de várias espécies de microalgas, uma das principais razões que as tornam uma fonte não convencional de proteína (CORNET, 1998; SOLETTTO *et al.* 2005).

Carboidratos em microalgas podem ser encontrados na forma de amido, glicose, açúcares e outros polissacarídeos. A média de lipídios contidos nas várias células de microalgas está entre 1% e 40% mas pode chegar a 85% da massa seca sob certas condições (BECKER, 2004,). Os lipídios em microalgas são compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos (contendo entre 12 e 22 carbonos) podendo ser tanto saturados, quanto mono ou poliinsaturados (DERNER, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006). De todos os ácidos graxos na microalga, alguns ácidos graxos da família de  $\omega 3$  e  $\omega 6$  são de especial interesse, pois estão relacionados com a diminuição dos níveis de colesterol e não são produzidos pelo organismo humano. A quantidade total e a qualidade de ácidos graxos podem ser afetadas pela nutrição e fatores do meio de cultivo, como limitação de nitrogênio, por exemplo, (METTING, 1996; SIMOPOULOS, 2002; TZOVENIS *et al.*, 2003; BOROWITZKA, 1988).

Microalgas representam ainda uma fonte valiosa de vitaminas essenciais (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, biotina, ácido fólico) (BECKER, 1994). Vitaminas provam o valor nutricional das células das microalgas, mas suas quantidades variam com os fatores do ambiente, o tratamento de colheita e o método de secagem das células. As microalgas são ricas em pigmentos como clorofila (0,5% a 1% massa seca), carotenóides (0,1% a 0,2% de massa seca em média e acima de 14% de massa seca de  $\beta$ -caroteno na *Dunaliella*) e ficobiliproteínas. Estas moléculas têm uma ampla aplicação comercial (BROWN *et al.* 1999; BOROWITZKA, 1988).

### 2.3.2 Aplicações de Microalgas

A imensa biodiversidade e, conseqüente, variabilidade na composição bioquímica destes microrganismos, aliada ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala vêm permitindo que microalgas sejam utilizadas em diversas aplicações (DERNER, 2006).

Muitas vezes, alimentos funcionais são tradicionalmente alimentos enriquecidos com ingredientes que promovem uma ação específica benéfica à saúde humana. Estes são chamados de ingredientes funcionais. Esses ingredientes são preferencialmente de origem natural, como as plantas e às vezes algas e/ou microalgas, por isso esses tipos de fontes marinhas estão recebendo cada vez mais atenção (HERRERO *et al.*, 2005).

Atualmente as microalgas são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas em pó, na forma de tabletes, cápsulas ou extratos (Figura 2). Microalgas também são incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, etc., tanto como suplemento nutricional como corante natural (YAMAGUCHI, 1997; BOROWITZKA, 1999; APT e BEHRENS, 1999; SOLETTTO *et al.* 2005; DERNER, 2006).

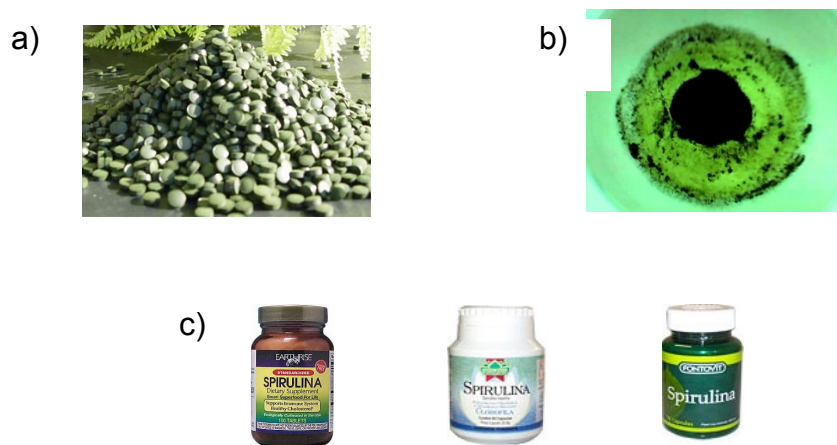


Figura 2 - Exemplos de formas comerciais de *Spirulina*; a) tabletes de microalgas para consumo humano; b) *Spirulina* em pó; c) cápsulas embaladas da microalga *Spirulina sp.* usadas como suplemento nutricional, repondo proteínas, vitaminas e minerais.  
 FONTE: SPIRULINA WORLD, HARDBODY NUTRITION e CORPO PERFEITO (2006)

As principais microalgas cultivadas comercialmente são: *Spirulina sp.* e *Chlorella sp.* Para a adição em alimentos naturais, usa-se *Dunaliella salina* para a

obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis* para a obtenção de astaxantina. Todas possuem uma quantidade alta de proteína, fator determinante para o alto valor nutricional da microalga (SPOLAORE *et al.*, 2006; DERNER, 2006).

Além da consolidada produção de microalgas para a obtenção de biomassa e compostos bioativos, as pesquisas relacionadas ao cultivo de microalgas ampliaram as perspectivas para a produção de novos combustíveis, biopolímeros, biofertilizantes, pesticidas, ácidos graxos e pigmentos (METTING, 1988, apud OLVERA-RAMÍREZ, 2000; SKULBERG, 2004, apud DERNER, 2006).

## 2.4 MICRORGANISMOS ESPECÍFICOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS

Em todos os organismos, além daqueles compostos envolvidos no metabolismo primário (os quais são determinantes das funções vitais básicas de um ser vivo) como os ácidos nucléicos, açúcares e proteínas, por exemplo, ou ainda, a clorofila das algas e vegetais, existem também os produtos naturais (ou metabólitos secundários) como pigmentos acessórios, substâncias de defesa química contra a ação de microrganismos ou inimigos naturais, etc. (TEIXEIRA, 2002, apud DERNER, 2006).

Diversas cepas de cianobactérias, (microalgas procariontes), apresentam a capacidade de produzir compostos de interesse comercial de acordo com suas características e as condições de cultivo (LORETO *et al.*, 2003). Para melhorar a eficiência na produção de pigmentos, proteínas ou de metabólitos como atividade biológica, é necessário otimizar seu crescimento em função da temperatura, irradiação, salinidade, agitação, concentração e natureza de nutrientes em condições de laboratório (HOFFMANN, 1988).

Entre estas cianobactérias destacam-se *Anabaena*, *Spirulina*, *Calothrix*, *Synechococcus*, *Nostoc*, dentre outras.

*Spirulina* pertence ao grupo de cianobactérias filamentosas que incluem 13 espécies, crescem em água alcalina e representam uma rica fonte de proteínas (NIU *et al.*, 2007). Essa microalga é constituída de 60 - 70% de proteínas (base seca) e é considerada a fonte natural mais rica no mundo de vitamina B<sub>12</sub>, além de possuir uma

mistura natural de biopigmentos, com poderes funcionais (PIÑERO ESTRADA *et al.*, 2001).

A *Spirulina*, também chamada por alguns autores de *Arthrospira*, faz parte do reino Bactéria, divisão Cianobactéria, da classe Cianofíceas e da família *Oscillatoriaceae* e neste gênero a espécie mais importante é a *Spirulina platensis* (Figura 3), seguida pela *Spirulina fusiformes* e *Spirulina maxima*. Possuem filamentos helicoidais com comprimento de aproximadamente 200-300  $\mu\text{m}$  e 5-10  $\mu\text{m}$  de largura, têm alta tolerância para pH alcalino, é de fácil cultivo em larga escala e a parede celular é facilmente rompida (CHRONAKIS *et al.*, 2000; RANGEL –YAGUI *et al.*, 2004).

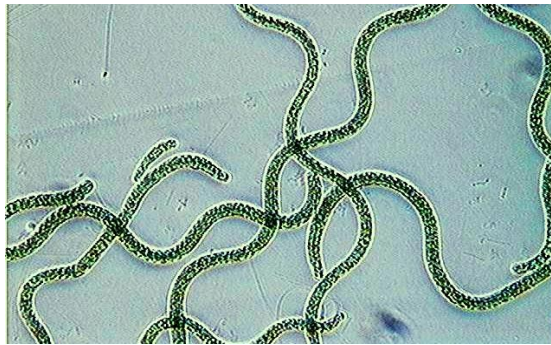


Figura 3 - Gênero *Spirulina* (microalga verde-azul) vista no microscópio (40x).  
FONTE: O autor (2008)

Pode-se classificar a *S. platensis* como uma microalga azul-verde que possui pigmentos fotossintéticos incluindo clorofila *a*, luteína,  $\beta$ -caroteno, ficocianina e aloficocianina, os maiores componentes bioativos na microalga (CHEN *et al.*, 1996). A ficocianina, um pigmento de cor brilhante da classe das ficobilinas encontra-se nos ficobilissomos – complexos proteína-pigmento, compostos principalmente (80-85%) de polipeptídios (SZALONTAI *et al.*, 1994 ; EDWARDS *et al.*, 1996).

*S. platensis* tem sido comercializada em vários países e seus componentes usados como nutrientes no consumo animal e humano, como corante natural em alimentos, cosméticos e em farmacêuticos (CHEN *et al.*, 1996).

Vários estudos mostram que extratos de *Spirulina* podem prevenir ou inibir câncer nos humanos e animais e são poderosos tônicos para o sistema imunológico,



alimentando o mecanismo celular de defesa (PANG *et al.*, 1998; QURESHI *et al.*, 1996, apud PIÑERO ESTRADA *et al.*, 2001).

Algumas espécies de cianobactérias são tóxicas, como ocorre com alguns cogumelos e plantas. São espécies selvagens que crescem em lagos e vias fluviais, consumindo quaisquer nutrientes que estejam na água. A maioria das espécies de *Anabaena* e *Aphanizomenon flos-aquae* apresentam toxinas. No entanto, centenas de estudos científicos publicados durante trinta anos, não documentaram nenhuma toxicidade da microalga *Spirulina*. Por isso, sabe-se bem que esta microalga tem seu uso seguro e nutritivo. Entretanto esta toxicidade pode ocorrer através da contaminação do cultivo com o contato da cultura de *Spirulina* com outras microalgas tóxicas (HENRIKSON, 1994; MULITERNO *et al.*, 2005).

Em relação a outras microalgas que produzem biopigmentos, como a cianobactéria filamentosa *Calothrix sp.*, destacam-se sua habilidade em fixar nitrogênio atmosférico, produzir enzimas e toxinas com atividade farmacológica e requer simples nutrição, quando comparada com outros microrganismos (BERGMAN *et al.*, 1997; OLVERA-RAMÍREZ, 2000).

Tratando-se de cianobactérias termófilas, organismos que toleram calor, como *Synechococcus sp.*, outras espécies e linhagens, verifica-se que sua temperatura de crescimento é aproximadamente 55 °C, temperatura alta quando comparada com microalgas não termófilas, onde as condições de cultivo ficam entre 25-30 °C. Existem ainda termófilos que crescem até 90 °C e hipertermófilos que existem acima de 90 °C.

Esse efeito de temperatura é interessante para examinar as propriedades e a estabilidade, como proteínas nas microalgas, já que algumas proteínas sofrem desnaturação em altas temperaturas (BERNS e SCOTT, 1966; EDWARDS *et al.*, 1997).

## 2.5 FICOCIANINA

As cianobactérias realizam a fotossíntese, similarmente às plantas superiores. Entretanto, em vez de cloroplastos, possuem uma estrutura membranosa chamada de tilacóides, onde ficobilissomos, moléculas complexas nos quais estão organizadas as

ficobiliproteínas, são encontrados (ABALDE *et al.*, 1998; SUN, WANG e QIAO, 2006). A Figura 4 representa bem o que exatamente são essas estruturas.

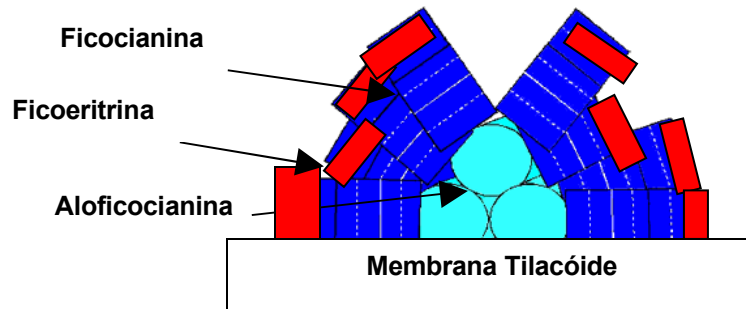


Figura 4 - Modelo estrutural de ficobilissomos de *Spirulina platensis*.  
FONTE: Adaptado de SCHLUCHTER (1994)

Ficobiliproteínas ou ficobilinas são da família hidrofílica de pigmentos de natureza protéica, solúveis em água e muito fluorescentes, presentes em cianobactérias, algas vermelhas eucariotes e criptomônadas. Mais especificamente são antenas de pigmentos coletores de luz, e apresentam cromóforos chamados de bilinas. As ficobiliproteínas são classificadas pelos três principais pigmentos ou cromóforos, dependendo da cor e das propriedades de absorbância: ficoeritrina (vermelho), ficocianina (azul brilhante) e aloficocianina (verde-azul) (SANTOS *et al.*, 2003; SONI *et al.* 2006). As absorções máximas para ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina estão entre 610-640 nm, 540-575 nm e 650-655 nm, respectivamente (ABALDE *et al.*, 1998; SONI *et al.* 2006; SUN, WANG e QIAO, 2006).

Neste sentido, pode-se dizer que a ficocianina é a ficobiliproteína mais abundante e importante, reportada pela primeira vez em 1928 por Lemberg (PATEL *et al.*, 2005; PATIL *et al.*, 2006). A ficocianina é formada por proteína e cromóforo e esta proteína consiste em subunidades chamadas  $\alpha$  e  $\beta$  com 1 ( $\alpha$ ) e 2 ( $\beta$ ) grupos ficocianobilinas. Há diferentes estruturas cristalinas para diferentes ficocianinas, ou seja, as subunidades podem ser associadas em monômeros ( $\alpha\beta$ ), em trímeros ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> e hexâmeros ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>. Um trímero de ficocianina ou aloficocianina são discos agregados, com aproximadamente 11 nm de diâmetro e 3 nm de espessura, um hexâmero é organizado por duas pilhas de trímeros, com 6 nm de espessura. Por exemplo, a ficocianina de *Calothrix sp.*, *Spirulina sp.* e *Phormidium sp.* têm peso molecular de 114 kDa, 41.2 kDa e 43.5 kDa, respectivamente e possuem a estrutura trímero ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> da

molécula, já a *Lyngbya sp.* com peso molecular de 81 kDa apresenta um dímero (SANTOS *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2005; NAKAMOTO e HONMA, 2006; SUN, WANG e QIAO, 2006).

Silveira *et al.* (2007) demonstraram que a pureza do extrato bruto, a partir da *Spirulina platensis*, foi influenciada pela temperatura, ou seja, altas temperaturas resultaram em redução da pureza, facilitando a extração de outras proteínas. Desde que a concentração de ficocianina seja minimamente afetada pela temperatura, o aumento da mesma não melhora a extração de pigmento (SILVEIRA *et al.*, 2007). Os mesmos autores relataram redução da concentração de ficocianina com a mudança da temperatura de 23,6 °C para 41 °C, provavelmente pela desnaturação de ficocianina. Sarada, Pillai e Ravishankar (1999) investigaram o efeito da temperatura na estabilidade de ficocianina e constataram que é altamente instável em 45 °C e acima. E ainda, que acima de 30 °C a ficocianina perde gradualmente sua cor, e é bastante estável em 10 e 4 °C por um longo período.

Outros autores publicaram que a desnaturação e/ou degradação da proteína e ainda sua quantidade estão relacionados com temperaturas elevadas (EISELE *et al.*, 2000; MORIST *et al.*, 2001; NAKAMATO e HONMA, 2006). Por outro lado, Edwards *et al.* (1997) relataram que a ficocianina purificada de *Synechococcus lividus* é bastante estável em temperaturas onde as outras ficocianinas desnaturam e que há somente a dissociação da proteína sem envolvimento da desnaturação. Muitas vezes a desnaturação é irreversível, por isso melhores e mais estudos devem ser feitos para verificar a estabilidade do pigmento-proteína ficocianina em altas temperaturas.

A pureza da ficocianina é geralmente avaliada usando a razão de absorbância de  $Abs_{620}/Abs_{280}$ , onde  $Abs_{620}$  representa a absorbância de ficocianina no comprimento de onda de 620 nm e  $Abs_{280}$  é a absorbância de outras proteínas em 280 nm. Se o valor obtido, nesta razão, for 1 ou < 1, a pureza da proteína é considerada baixa e pode ser usada na indústria de alimentos e cosméticos. Enquanto que  $Abs_{620}/Abs_{280} \geq 4$  é considerada de alto grau de pureza e pode ser utilizada em indústrias farmacêuticas (REIS *et al.*, 1998).

Em suma, a ficocianina possui características importantes como: ser uma proteína natural, de cor azul única, boa solubilidade em água, alta estabilidade na faixa de pH 5-7, fluorescência e propriedades terapêuticas, com atividades antioxidante e antiinflamatória com uma promissora aplicação em diagnósticos, pois o purificado

possui propriedades fluorescentes que possibilita a utilização em ensaios imunológicos. Por ser um pigmento natural, pode ser utilizado na indústria de alimentos, como corante, por exemplo, em sucos e gomas e na indústria de cosméticos, substituindo os corantes sintéticos (SARADA, PILLAI AND RAVISHANKAR (1999); DOWNHAM e COLLINS, 2000; MINKOVA *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2005; SONI *et al.*, 2006).

## 2.6PRODUÇÃO DE MICROALGAS

O cultivo de microalgas, para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese, é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países e a produção está a cargo de grandes empresas (DERNER, 2006). Na Tabela 3, a seguir, verifica-se como está o presente estado da produção de microalgas.

TABELA 3 - PRODUÇÃO DE MICROALGAS ATUALMENTE NO MUNDO

Microalgas	Produção anual (t massa seca)	País produtor	Aplicações e produtos
<i>Spirulina</i>	3000	China, Índia, USA, Japão	Nutrição animal e humana, cosméticos, ficocianina
<i>Chlorella</i>	2000	Taiwán, Alemanha e Japão	Nutrição humana, cosméticos e aquicultura
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Australia, Israel, USA e China	Nutrição humana, cosméticos e $\beta$ - caroteno
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500	USA	Nutrição humana
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300	USA, Índia e Israel	Aquicultura e astaxantina

FONTE: SPOLAORE (2006)

A microalga *Spirulina platensis* pode sofrer variações no crescimento de acordo com o meio de cultivo utilizado e as condições do meio externo. A manipulação das condições de cultivo pode estimular a biosíntese de compostos e, além disso, pode-se

controlar essas variáveis, a fim de diminuir os custos do processo de produção (MULITERNO *et al.*, 2005).

#### 2.6.1 Cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de cultivo, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Em geral, os sistemas de produção industrial são pouco sofisticados, uma vez que muitas empresas desenvolvem cultivos a céu aberto em tanques com fundo de terra e com baixo ou nenhum controle dos parâmetros ambientais. Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos processos de produção (agropecuária, de dejetos domésticos, por exemplo). Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamentos específicos, denominados fotobiorreatores, nos quais é possível controlar os parâmetros ambientais. Isto implica numa elevada produtividade, a qual viabiliza a produção comercial de compostos de elevado valor (BROWITZKA, 1999, TREDICI, 2004, apud DERNER, 2006).

Os biorreatores ou fotobiorreatores mais usados para o cultivo de *S. platensis* podem trabalhar em batelada (descontínuo) ou em batelada alimentada (semicontínuo), que é a adição intermitente de um substrato limitante ao longo da fermentação. Chen e Zhang (1997) fizeram adição, depois de 108 h do cultivo em batelada, a cada 1 h de 10 ml de glicose na concentração de 100 g/l. Este sistema permite um aumento no período produtivo do processo e evita os efeitos tóxicos das elevadas concentrações iniciais de substrato, como ocorre nos processos em batelada (CHEN e ZHANG, 1997; MULITERNO *et al.*, 2005; CHEN *et al.* 2006). Os cultivos com esses biorreatores podem ser: ao ar livre em larga escala ou escala laboratorial. No meio ambiente, ou seja, em lagos ou vias fluviais, o crescimento da microalga *S. platensis* pode ser afetado com a contaminação de outras algas de pouco interesse, mas sistemas de lagoas especialmente projetados e condições controladas, não permitem o crescimento de contaminantes.

A produção em larga escala é feita em vias fluviais, lagoas ou tanques (Figura 5).

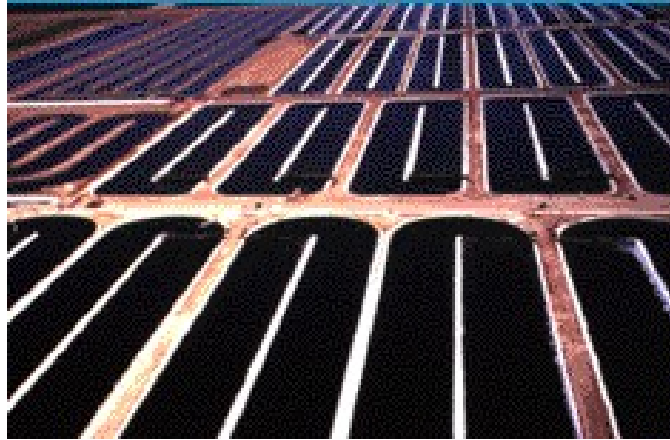


Figura 5 - Cultivo de *Spirulina platensis* em larga escala em vias fluviais.  
FONTE: HENRIKSON (1997)

#### 2.6.2 Meios de Cultivo para Microalgas

Para o crescimento ótimo as microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes. Entre as espécies, ocorrem muitas variações relacionadas principalmente à quantidade dos nutrientes no meio. Ainda assim, estas necessidades nutricionais são dependentes de distintas condições ambientais. Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem C, N, O, H e P, além de Ca, Mg, S e K. Como micronutrientes, geralmente requerem Fe, Mn, Cu, Mo e Co, enquanto algumas microalgas também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura (ABALDE *et al.*, 1995; GUILLARD, 1975, apud DERNER, 2006).

Existem muitos meios para a *S. platensis*, como o meio sintético Zarrouk (1966), o mais utilizado. A diluição deste meio torna-se uma alternativa a ser analisada, uma vez que a alta concentração de sais do mesmo aumenta os custos de produção (MULITERNO *et al.*, 2005). Reinehr (2001) e Muliterno *et al.* (2005) com 20% e 75%, respectivamente, de meio Zarrouk diluído, obtiveram melhores resultados na produtividade da microalga *S. platensis*. Isto significa que o meio sintético usualmente utilizado para o cultivo da microalga em questão, proposto por Zarrouk (1966), tem

concentrações de sais superestimadas. Pode-se utilizar ainda este meio com algumas modificações em seus componentes, ou seja, a substituição ou retirada dos mesmos, como feito por Sarada, Pillai and Ravishankar (1999).

A Tabela 4 abaixo mostra uma listagem dos sais e soluções, utilizados para o preparo do meio Zarrouk.

TABELA 4 - SAIS E SOLUÇÕES DO MEIO ZARROUK

Sais	Solução A <sub>5</sub>	Solução B <sub>6</sub>
NaHCO <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>
K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O
NaNO <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CuCO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
NaCl	MnO <sub>3</sub>	TiSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .8 H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	----	CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub>	----	----
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	----	----
EDTA	----	----

FONTE: ZARROUK (1966)

Além dos fatores anteriormente descritos, outros podem influenciar o desenvolvimento das culturas como o tamanho dos tanques, tamanho das células (volume celular), concentrações de inóculo, aeração das culturas, pH, etc. (CHEN e ZHANG 1997; MULITERNO *et al.*, 2005; DERNER, 2006).

### 2.6.3 Nutrição para Cultivo de Microalgas

De acordo com Derner (2006), ainda que a principal fonte de carbono empregada nos cultivos seja o dióxido de carbono, diversos estudos têm comprovado que as microalgas podem crescer empregando diferentes rotas nutricionais e, especialmente utilizando compostos orgânicos como glicose, acetato, lactato, aminoácidos ou outros substratos.

O cultivo da *S. platensis* pode ser fotoautotrófico, heterótrofo e mixotrófico. A cultura mixotrófica é uma alternativa à cultura convencional fotoautotrófica, ambas utilizam luz como fonte de energia para a produção de pigmentos fotossintéticos, mas a diferença entre elas é que a primeira, além da utilização da energia da luz, a cianobactéria obtém parte da energia utilizando como substrato carbono orgânico (glicose, acetato, etc) (CHEN e ZHANG, 1997). E ainda, em cultura mixotrófica ocorre um processo de limitação em que baixas intensidades luminosas ou baixas concentrações de carbono orgânico podem limitar o crescimento celular, e altas intensidades de luz ou altas concentrações de carbono podem inibir o crescimento celular (ZHANG *et al.*, 1999).

Segundo os mesmo autores e Derner (2006), a escolha de um ou outro cultivo depende dos produtos de interesse (biomassa, ácidos graxos, pigmentos, etc.) que as microalgas podem sintetizar naquelas condições de cultivo. O cultivo heterotrófico tem sido desenvolvido para a produção de ácidos graxos por algumas espécies de microalgas, entretanto este tipo de cultivo geralmente não pode ser aplicado para a obtenção de pigmentos, pois não utiliza luz como fonte de energia, assim a *S. platensis* não produz ficocianina, o pigmento fotossintético de interesse. No cultivo fotossintético a fixação do carbono inorgânico é influenciada pela intensidade de luz, enquanto que a assimilação heterotrófica de carbono é influenciada pela disponibilidade de carbono orgânico no meio (ZANG *et al.*, 1999).

Muliterno *et al.* (2005), e Chen *et al.* (2006) utilizaram a cultura mixotrófica, os dois primeiros com glicose como fonte de carbono, e o último usando acetato e, em outra cultura, bicarbonato. Sabendo que os resultados dependem não somente do tipo de nutrição, mas também de outros fatores importantes, como as condições de cultivo e o processo de produção em si, os valores mais expressivos foram os encontrados com a suplementação com glicose.

Segundo Muliterno *et al.* (2005) e Chen e Zhang (1997), as concentrações do substrato carbono (glicose), que devem permanecer dentro do biorreator (podem variar de 0,5 a 2 g.L<sup>-1</sup>) ou aquelas que suplementam o mesmo (180 e 100 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente aos autores), em um semicontínuo, também influenciam na produtividade da microalga *S. platensis* e, conseqüentemente, na produção do pigmento ficocianina.



Concentrações de sal no meio, também podem criar um estresse salino para a microalga. Esse estresse é geralmente acompanhado por fotoinibição da fotossíntese. Isto foi indicado pela adaptação da *S. platensis* com o aumento de carboidratos nas células, incluindo a degradação de proteína. E ainda, alta intensidade de luz no período de crescimento celular mostrou baixa capacidade de recuperação na atividade fotossintética. Isto resulta do fato que células estressadas têm uma baixa capacidade de síntese de proteínas e assim lenta reparação do mecanismo, ou seja, dificuldade no processo de adaptação (ZENG e VONSHAK, 1998).

#### 2.6.4 Condições de Cultivo de Microalgas

Nas microalgas, a resposta das células às condições ambientais define os fatores como limitante - redução da taxa de crescimento e/ou de alguma reação bioquímica sem a necessidade de aclimação celular; ou estressante - implica num desequilíbrio metabólico, o qual demanda ajustes bioquímicos antes que as células possam estabelecer um novo estado de crescimento ou biossíntese (DERNER, 2006).

Neste sentido parâmetros como: a temperatura do cultivo (SÁNCHEZ-LUNA *et al.* 2004; COLLA *et al.*, 2007), idade do inóculo (PELIZER *et al.*, 2003), quantidade e tipo de aeração (CONVERTI *et al.*, 2006; ONCEL e SUKAN, 2007) e geometria de fotobiorreatores (QIANG, FAIMAN e RICHMOND, 1998; COSTA *et al.*, 2000; LEE, 2001; TRAVIESO *et al.*, 2001; CONTRERAS-FLORES *et al.*, 2003), também influenciam decisivamente os resultados de crescimento celular como também os componentes da biomassa e produtos de interesse, dentre eles: pigmentos, proteínas, lipídios, ácidos graxos, etc.

Sendo assim, a concentração do inóculo é importante para que se tenha uma boa quantidade da microalga para iniciar o cultivo. De acordo com Muliterno *et al.* (2005), esta concentração é de 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

Outro parâmetro é a temperatura que também tem impacto no cultivo da microalga, por isso a temperatura de cultivo para a *Spirulina platensis* se estende de 18 °C a 35 °C, sendo que o seu ótimo está a 30 ± 2 °C (CHOJNACKA e NOWORYTA,

2004; PATEL *et al.* 2005; MULITERNO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006, COLLA *et al.*, 2007).

Os autores: Ogbonna, Yada e Tanaka (1995); Chen e Zang (1997); Zeng e Vonshak (1998); Danesi *et al.* (2004); Rangel-Yagui *et al.* (2004); Converti *et al.* (2006); Muliterno *et al.* (2005), estudaram a influência da intensidade de luz no cultivo, um indicativo de que a luminosidade pode ser um fator limitante para o bom ou ruim crescimento celular, velocidade específica de crescimento e produtividade. Segundo Derner (2006), estudos demonstram que a taxa fotossintética apresenta um incremento proporcional à intensidade luminosa e se nivela em altas intensidades, chegando a um nível de saturação ou de máxima produção. Este valor (intensidade luminosa) ao ser ultrapassado pode causar uma redução da atividade fotossintética devido ao efeito da inibição na produção de pigmentos, da fotoxidação dos mesmos e também das enzimas envolvidas no processo fotossintético. Para a produção de *Spirulina platensis*, Chen *et al.* (2006); Muliterno *et al.* (2005) e Sarada, Pillai and Ravishankar (1999), usaram lâmpadas fluorescentes fornecendo intensidade de fluxo luminoso de 1800/3000 lux e 4000 lux, respectivamente.

Da mesma forma, Mendes e Wagener (2001) apud Derner (2006), verificaram que a utilização de luz solar concentrada (pelo emprego de refletores) acarretou num aumento de até 270% na produtividade de *Spirulina platensis*, enquanto causou uma redução na concentração de proteínas e ficocianina e um aumento no teor de carboidratos e clorofila. Por outro lado, Torzillo e Bernardini (1991), relataram que, em cultivos de *Spirulina*, 34% da biomassa que é produzida durante o período de luz pode ser perdida através da respiração. Dentro deste conceito, Vonshak *et al.* (1982) estudaram a produção de *Spirulina* e verificaram que o potencial fotossintético das células diminui nas concentrações celulares entre 0,4 e 1,0 g.L<sup>-1</sup>, pois a maioria das células não recebe luz suficiente e em concentrações de biomassa de 0,5 g.L<sup>-1</sup> (considerada ideal para a máxima eficiência fotossintética), aproximadamente 80% das células ficam em completa ausência de luz por alguns instantes. Desta forma, baixas concentrações de biomassa e altas taxas de crescimento específico são esperadas em sistemas onde a luz é um fator limitante.

Portanto em cultivos fotoautotróficos, a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético irá repercutir na quantidade de carbono que pode

ser fixado determinando, conseqüentemente, a produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas microalgais.

De acordo com Alava, Mello e Wagener (1997) e Derner (2006), o CO<sub>2</sub> é a fonte de carbono preferida pelas microalgas, uma vez que se difunde rapidamente (difusão passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de fixação. Em cultivos fotoautotróficos, o dióxido de carbono disponibilizado para as células microalgais, tanto pode ser proveniente (por difusão) do ar atmosférico (0,036% de CO<sub>2</sub>) injetado na cultura na forma de bolhas quando proveniente de cilindros pressurizados contendo este gás.

É certo que dependendo do tipo, do meio e das condições de cultivo desenvolvidos, a taxa de crescimento, a produtividade e especialmente a composição bioquímica da biomassa poderão sofrer intensas alterações (LEE, 2004 apud DERNER, 2006).

## 2.7 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS

A completa extração de ficobiliproteínas é um dos passos cruciais para a identificação e quantificação dessas proteínas na cianobactéria. Sendo a ficocianina um produto intracelular, em geral é necessário o rompimento da célula para a sua obtenção.

Uma das técnicas de rompimento celular mais usada é o choque osmótico, que pode ser com um tampão fosfato, ou acetato, ou ainda com água destilada. A extração pode ser feita apenas com adição desses solventes, mas também associando os métodos químicos aos físicos, como congelamento/descongelamento, maceração gral/pistilo, digestão, sonicação (uso de ultrasom), homogeneização por pressão, *French press*, conforme relatado por Reis *et al.* (1998); Patel *et al.* (2005); Chen *et al.* (2006); Patil *et al.* (2006); Sun, Wang e Qiao (2006).

Com o objeto de obter melhor extração de ficobiliproteínas, Gómez-Lojero *et al.* (1997), realizaram a extração por meio da união do choque osmótico com tampão fosfato seguido de centrifugação e maceração da biomassa. No lugar da maceração, Hayashi *et al.* (1997), Sloth, Wiebe e Eriksen (2006), relataram o rompimento celular por

congelamento / descongelamento. O congelamento / descongelamento em sucessivos ciclos é o método mais usado para extração de ficobiliproteínas e foi documentado por vários autores dentre eles: Tchernov *et al.* (1999); Soni *et al.* (2006); Patel *et al.* (2005).

Piñero Estrada *et al.* (2001), conseguiram o extrato bruto de ficobiliproteínas através da digestão da biomassa com água destilada em 24 h. Silveira *et al.* (2007) também mostraram estudos envolvendo extração de ficocianina a partir de água e de outros solventes como tampão fosfato, acetato, solução de cloreto de sódio (NaCl) e  $\text{CaCl}_2$  e a influência da temperatura e da taxa biomassa-solvente na extração do pigmento com o tempo. E concluíram que água pode ser uma alternativa para a extração de pigmentos, pois produz alta concentração de ficocianina, além de ter baixo custo e a possibilidade de escalonamento.

Outra extração utilizando fluidos supercríticos, reportado por Mendiola *et al.* (2007), é uma importante alternativa do tradicional método de extração com solventes, pois é rápida e eficiente, eliminando etapas e evita o uso de solventes orgânicos que são potencialmente prejudiciais, em termos de impactos ambientais.

Sarada, Pillai and Ravishankar (1999) pesquisaram a extração de ficobiliproteínas utilizando métodos químicos e físicos como: extração com água destilada, maceração gral/pistilo, extração ácida, por congelamento/descongelamento e como a secagem de biomassa pode afetar a recuperação de ficocianina. Os mesmos autores concluíram que o rompimento utilizando duas extrações com a homogeneização (gral/pistilo) foi a que obteve maior quantidade de ficocianina, e a secagem da biomassa com *spray dryer* também teve bons resultados. Todavia, deve-se levar em consideração a contaminação por clorofila obtida no processo de rompimento celular por maceração, documentada por esses autores, que investiram no congelamento/descongelamento, por produzir uma solução de ficocianina com menos contaminantes.

No mesmo sentido de obter extratos brutos com maior pureza e concentração de ficocianina, Abalde *et al.* (1998), analisaram três métodos de extração usando água destilada: sonicação a 4 °C, três ciclos de congelamento com nitrogênio líquido e descongelamento a 4 °C e o mesmo número de ciclos de congelamento a - 21 °C e descongelamento 4 °C. Como o último método foi o mais eficiente, esses autores testaram e compararam diferentes soluções de extração, empregadas no congelamento/descongelamento, e as com melhores resultados são: água destilada, fase alcalina,

Tris-HCl 0,05 M (pH= 7). Para posterior purificação escolheram o extrato bruto obtido em 3 ciclos de congelamento a  $-21^{\circ}\text{C}$  e descongelamento a  $4^{\circ}\text{C}$  em fase alcalina.

A desintegração enzimática da parede celular provocada por uma enzima, lisozima, por exemplo, foi documentada por Santiago-Santos *et al.* (2004), e pode ser uma alternativa para os métodos químicos e físicos existentes.

Dando seqüência a extração, após o rompimento é necessária a separação do extrato com uma nova centrifugação. O precipitado é descartado, pois contém células rompidas (debris) e compostos que não são de interesse. Por sua vez, o sobrenadante contém o pigmento de interesse (ficocianina), outras proteínas, tampão (quando houver) e ainda pode conter outros pigmentos como a aloficocianina e a ficoeritrina. Esse sobrenadante é reservado para o próximo passo, a purificação.

Vários métodos têm sido reportados para a purificação de ficobiliproteínas envolvendo a combinação de várias técnicas como a centrifugação, precipitação com sulfato de amônio  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ , diálise, cromatografia de troca iônica, cromatografia em gel de filtração, cromatografia em hidroxipatita e cromatografia de adsorção em leito expandido.

Fukui *et al.* (2004); Santiago-Santos *et al.* (2004); Felipe e Bermejo (2006); Sun, Wang e Qiao (2006), propuseram a cromatografia de troca iônica como sendo o método para a purificação de ficocianina viável e Abalde *et al.* (1998) acrescentou a cromatografia de interação hidrofóbica para o procedimento em dois passos. Minkova *et al.* (2003) optou por fazer a purificação em vários passos, utilizando solução aquosa de rivanol e precipitação por fracionamento com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os autores como Pádula *et al.* (1996); Madhyastha *et al.* (2005); Patel *et al.* (2005); Soni *et al.* (2006), também utilizaram a precipitação de ficobiliproteínas com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como um dos passos da purificação, mas uniram outros métodos, por exemplo, cromatografia de gel de filtração e cromatografia de troca iônica.

Cada uma dessas etapas afeta o processo de recuperação global, assim como a economia do mesmo, aumentando os custos de produção, o tempo e em geral, são complexos e dificultam o escalonamento (FELIPE e BERMEJO, 2006; SONI *et al.*, 2006; NIU *et al.*, 2007). Grande parte dos custos de produção estão nos passos de purificação, por isso a necessidade de técnicas de bioseparação eficientes, efetivas e econômicas para aplicação em maior escala. Deste modo Patil *et al.* (2006) e Patil e Raghavarao (2007), utilizaram um método de purificação que envolveu a extração com

duas fases aquosas, onde há a separação de biomoléculas a partir de duas ou mais fases aquosas imiscíveis e relataram que é a melhor alternativa para os métodos existentes, pois reduz os passos para alcançar uma alta pureza, diminui o tempo do processo e as perdas. Também com o propósito de otimizar o processo de purificação, Niu *et al.* (2007), estudaram a recuperação de ficocianina de *Spirulina platensis* usando cromatografia de adsorção em leite expandido e obtiveram ficocianina de alta pureza.

Uma das etapas de purificação é a quantificação de ficobiliproteínas, para isso, utiliza-se eletroforese de gel (SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio/gel de poliacrilamida), que pode determinar a massa molecular de ficobiliproteínas e de suas subunidades e ainda obter o ponto isoelétrico da mesma utilizando na análise diferentes pHs. Isto é feito por HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho), separando as subunidades, identificando e quantificando a fluorescência por espectrofotômetro. Estas análises não somente determinam o pigmento, mas também o purificam (GÓMEZ-LOJERO *et al.*, 1997; PIÑERO ESTRADA *et al.*, 2001; MINKOVA *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; SUN, WANG, QIAO, 2006).

Deste modo, para determinar o método específico de extração e de purificação deve-se verificar qual a microalga de trabalho, qual o extrato de interesse além da pureza desejada para o mesmo. É importante a escolha certa dos métodos, pois se sabe que 50-90% do custo de produção estão nos passos da purificação (PATIL e RAGHAVARAO, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a *Spirulina platensis paracas*, utilizada há alguns anos no Laboratório de Engenharia de Microalgas (Universidade Federal do Paraná) e originalmente fornecida pelo prof. Jorge A. V. Costa (FURG). A microalga é mantida rotineiramente por cultivos sucessivos em meio Zarrouk.

#### 3.2 MEIOS DE CULTIVO

##### 3.2.1 Meio de cultivo para *Spirulina platensis paracas*

O meio de cultivo mais utilizado para a produção de *Spirulina platensis* é o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e as quantidades de seus macronutrientes e micronutrientes encontram-se nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

TABELA 5 - QUANTIDADES DOS MACRONUTRIENTES DO MEIO ZARROUK.

Macronutrientes	Quantidade (g.L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0

NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA	0,08
FONTE: ZARROUK (1966)	

TABELA 6 - QUANTIDADES DOS MICRONUTRIENTES DO MEIO ZARROUK.

Micronutrientes (Solução A <sub>5</sub> )	Quantidades (g.L <sup>-1</sup> )	Micronutrientes (Solução B <sub>6</sub> )	Quantidades (g.L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	22,86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81	KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	192
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	44,8
CuCO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	17,94
MnO <sub>3</sub>	0,015	TiSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .8 H <sub>2</sub> O	61,1
-----	-----	CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	43,98

FONTE: ZARROUK (1966)

As soluções com os respectivos sais foram esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C em 1 atm, por 15 minutos e misturadas após resfriamento.

### 3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

- **pH**

O pH de cultivo corresponde ao pH do meio Zarrouk que está no intervalo de 9,5-10,5.

- **Temperatura**

Todas as culturas foram mantidas sob condições constantes de temperatura a 30 ± 2 °C, em sala climatizada.

- **Aeração**



Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores (Figura 6), frascos Erlenmeyer de 2 L com volume inicial de 1,5 L, com aeração contínua por borbulhamento de ar de 400 mL/min (0,08 vvm).

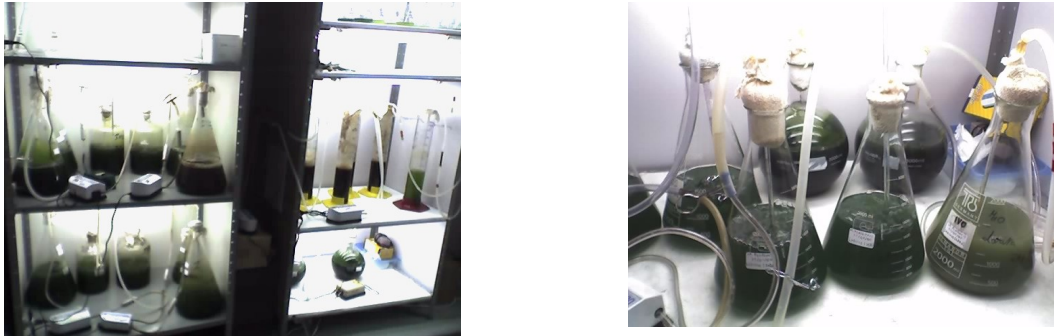


Figura 6 - Fotobiorreatores utilizados para cultivo de *Spirulina platensis*.  
FONTE: O autor (2008)

- **Fotoperíodo e iluminação**

Todos os experimentos foram realizados sob fotoperíodo de 12:12 h com lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W (extra luz do dia), com intensidade de 1,3 klux.

- **Inóculo**

Os inóculos foram mantidos em cultivo líquido do meio Zarrouk em condições controladas de temperatura, aeração e luz com concentração inicial entre 0,06-0,1 g.L<sup>-1</sup>. Após 20-30 dias de cultivo, os mesmos eram repicados, passando uma fração da cultura para outro fotobiorreator com meio Zarrouk.

### 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

- **Biomassa**

A determinação da biomassa foi realizada retirando-se amostras a cada 24 h (11 a.m), para a análise da turbidez e cálculo da concentração celular.

#### Determinação da absorbância

Coletaram-se 3 mL de amostra e determinou-se a absorbância no comprimento de onda de 670 nm (CHRONAKIS *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2004 e 2002; ANDRADE e COSTA, 2006; REICHERT, REINEHR e COSTA, 2006; COLLA *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007) utilizando-se espectrofotômetro Shimadzu, UV-1601PC (Kyoto, Japan).

#### Cálculo da concentração celular

A concentração celular foi obtida por uma correlação entre a massa seca de biomassa e a absorbância a 670 nm (ANEXO 1) dada pela fórmula:

$$X(g.L^{-1}) = 0,6134[Abs670nm] - 0,0242$$

#### Produtividade

O cálculo da produtividade da microalga foi feito pela equação:

$$P = (X_i - X_0)/t_i$$

onde:

P = produtividade (mg.L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>);

X<sub>0</sub> = concentração celular inicial (mg.L<sup>-1</sup>);

X<sub>i</sub> = concentração celular no tempo *i* (mg.L<sup>-1</sup>) e

t<sub>i</sub> = intervalo de tempo (dia) entre X<sub>0</sub> e X<sub>i</sub>.

#### Velocidades específicas de crescimento

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) (d<sup>-1</sup>) foi avaliada por um modelo de regressão polinomial utilizando o software Microsoft Excel 2007, através dos valores experimentais de concentração celular em função do tempo (d). A equação a seguir expressa esta velocidade:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

onde:

$\mu$  = velocidade específica ( $d^{-1}$ );                       $t$  = tempo de crescimento (dia) e  
 $X$  = concentração celular ( $g.L^{-1}$ ).

- **Precipitação de Biomassa**

A precipitação foi avaliada com diferentes tratamentos da cultura de *S. platensis*. Os tratamentos utilizados foram: diluição do cultivo com água destilada a 50%, o ajuste em diferentes pHs (próximos a 8, 7, 6 e 5) e a adição de diferentes concentrações de sal  $Na_2SO_4$  (concentrações de 10 mM, 20 mM, 50 mM e 100 mM). Os pHs foram ajustados com  $H_2SO_4$  0,1 M e medidos utilizando-se um pHmetro (HANNA Instruments).

A solução de sal  $Na_2SO_4$  utilizada foi 1 M com pH 6,9 e o volume utilizado, para a precipitação, foi o necessário para que a concentração de sal fosse a desejada e o volume final, em cada tubo de ensaio, fosse de 30 mL, ou seja, volume de solução de sal e volume de cultura da microalga. Por exemplo, para a concentração de sal de 100 mM e volume final no tubo de ensaio de 30 mL, utilizou-se 3 mL de solução de sal  $Na_2SO_4$  1 M e 27 mL de cultura de *S. platensis*.

Tubos de ensaios de iguais tamanhos e volume foram utilizados, a fim de determinar a velocidade e tempo de decantação dos diferentes tratamentos da cultura de microalga.

O pH da cultura de *Spirulina platensis* utilizada para a precipitação foi de 10,1 e os experimentos de precipitação com e sem tratamentos foram em duplicata, mantidos em refrigerador (8 °C), em repouso.

- **Isolamento da Microalga e Teste com Antibióticos**

A tentativa de isolamento da *Spirulina platensis* foi realizado com a inoculação da microalga na placa de Petri com ajuda de alça de platina a partir de uma cultura bem adaptada com um volume previamente centrifugado e em condições assépticas.

Outro experimento realizado foi para verificar a sensibilidade ou resistência da *Spirulina platensis* aos 10 antibióticos testados (Amoxicilina 10 mcg, Cloranfenicol 30 mcg, Penicilina 10 mcg, Ampicilina 10 mcg, Gentamicina 10 mcg, Cefalexina 30 mcg, Amicacina 30 mcg, Tetraciclina 30 mcg, Norfloxacin 10 mcg e Oxacilina 0,1 mcg).

- **Pigmento**

O pigmento ficocianina é extraído por rompimento celular através de ciclos de congelamento/descongelamento ou por extração mecânica utilizando *French press* ou o homogeneizador de alta pressão. A Figura 7 apresenta o fluxograma das etapas de cada método de extração e recuperação de ficocianina.



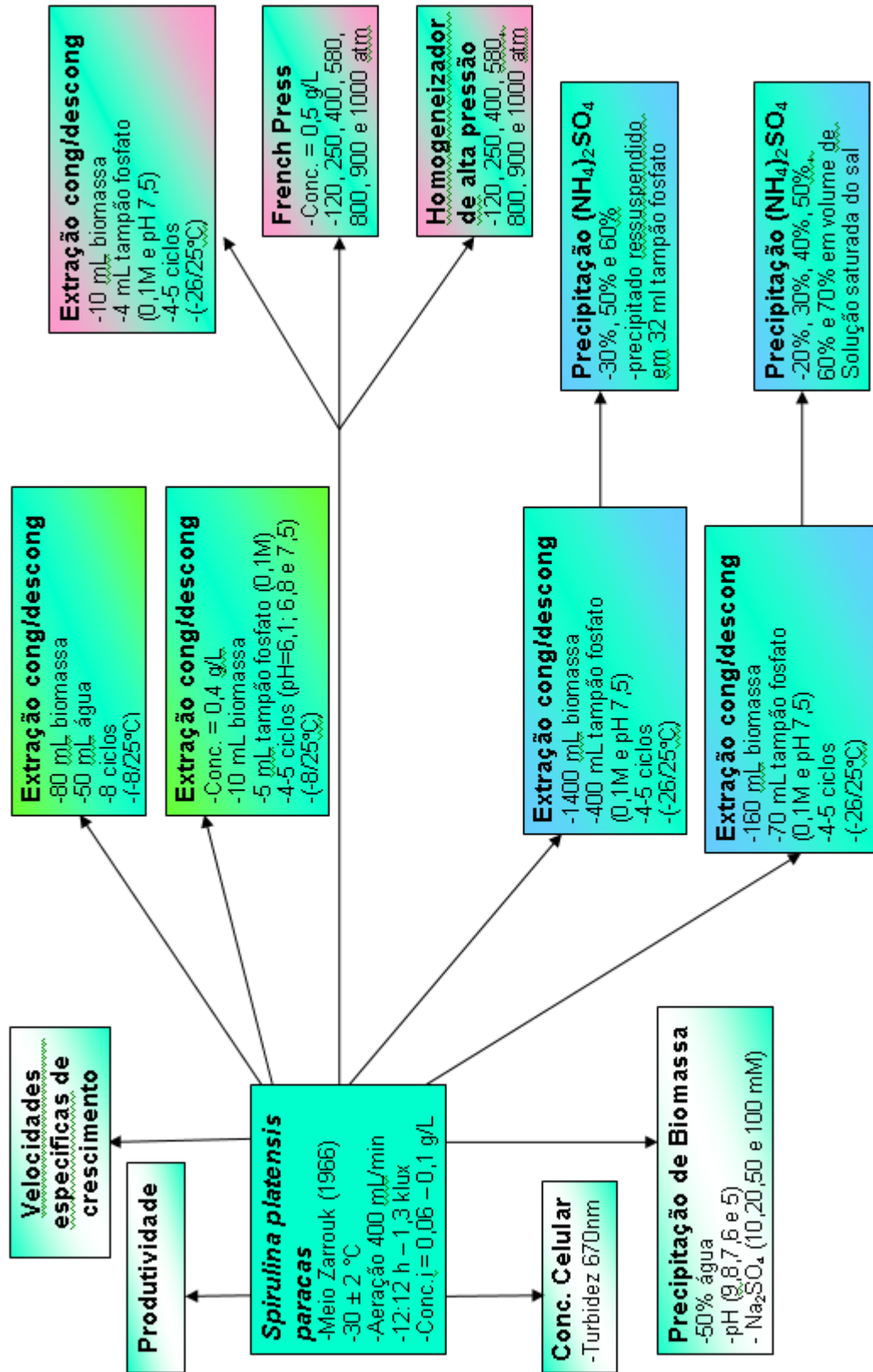


Figura 7 - Fluxograma dos métodos de extração e recuperação de ficocianina da microalga *Spirulina platensis*.

### Extração por congelamento/descongelamento

A concentração celular do cultivo usado para este experimento foi de  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ .

Diluíram-se 10 mL de cultivo de microalga em 20 mL de água, para facilitar a precipitação das células após centrifugação em tubo Falcon a 3700 rpm ( $2295,81 \times g$ ) por 25 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pigmento foi extraído do sedimento adicionando-se ao mesmo 5 mL de tampão fosfato 0,1 M. Os experimentos foram submetidos ao processo de ruptura celular por sucessivos ciclos de congelamento ( $-8^\circ\text{C}$ ) e descongelamento ( $25^\circ\text{C}$ ) em 4-5 ciclos nos pHs : 6,1; 6,8 e 7,5 de tampão fosfato 0,1 M.

O experimento, para verificar quantos ciclos eram necessários para a máxima extração do pigmento, foi feito com 60 ml de cultivo com concentração celular  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ , centrifugado e descartando o sobrenadante. A biomassa foi ressuspensa em 80 ml de água e transferida para um Becker para o processo de congelamento/descongelamento. Em cada ciclo de congelamento/descongelamento retirou-se 5 ml de amostra para leitura de absorbância até o total de oito ciclos.

### Extração mecânica

Um cultivo de *Spirulina platensis* com concentração celular de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  foi reservado para os rompimentos celulares.

Foram utilizados separadamente para comparação das eficiências dos dois equipamentos de rompimento celular: *French press Cell Disrupter* (Thermo Electron Corporation, EUA) e o Homogeneizador de alta Pressão (APV-2000, Dinamarca). Para o *French press* utilizaram-se 7 pressões diferentes (120, 250, 400, 580, 800, 900 e 1000 atm) e para cada teste de pressão 3,5 mL de cultura de microalga foram usados. Após o rompimento, 2 mL de amostra homogeneizada foram coletados, abrindo-se a válvula com uma vazão de 1 gota a cada 3-4 segundos. As frações coletadas em ependorf foram centrifugadas a 5000 rpm ( $1956,5 \times g$ ) (Centrífuga Jouan AS) por 5 minutos para separar os debrís celulares. No Homogeneizador de alta pressão utilizou-se 50 ml da mesma cultura de microalga para cada pressão aplicada. As pressões foram as mesmas usadas no *French press*, incluindo 30 e 50 atm, sem reciclo. A centrifugação após rompimento foi de 5000 rpm ( $4192,5 \times g$ ) (Centrífuga

Sorvall® Legend™ Mach 1,6/R) por 15 minutos. As centrifugações foram suficientes para a separação dos debrís celulares dos extratos.

#### Purificação/recuperação

O fluxograma para obtenção de ficocianina concentrada da microalga *Spirulina platensis*, está ilustrado na Figura 8, a seguir.

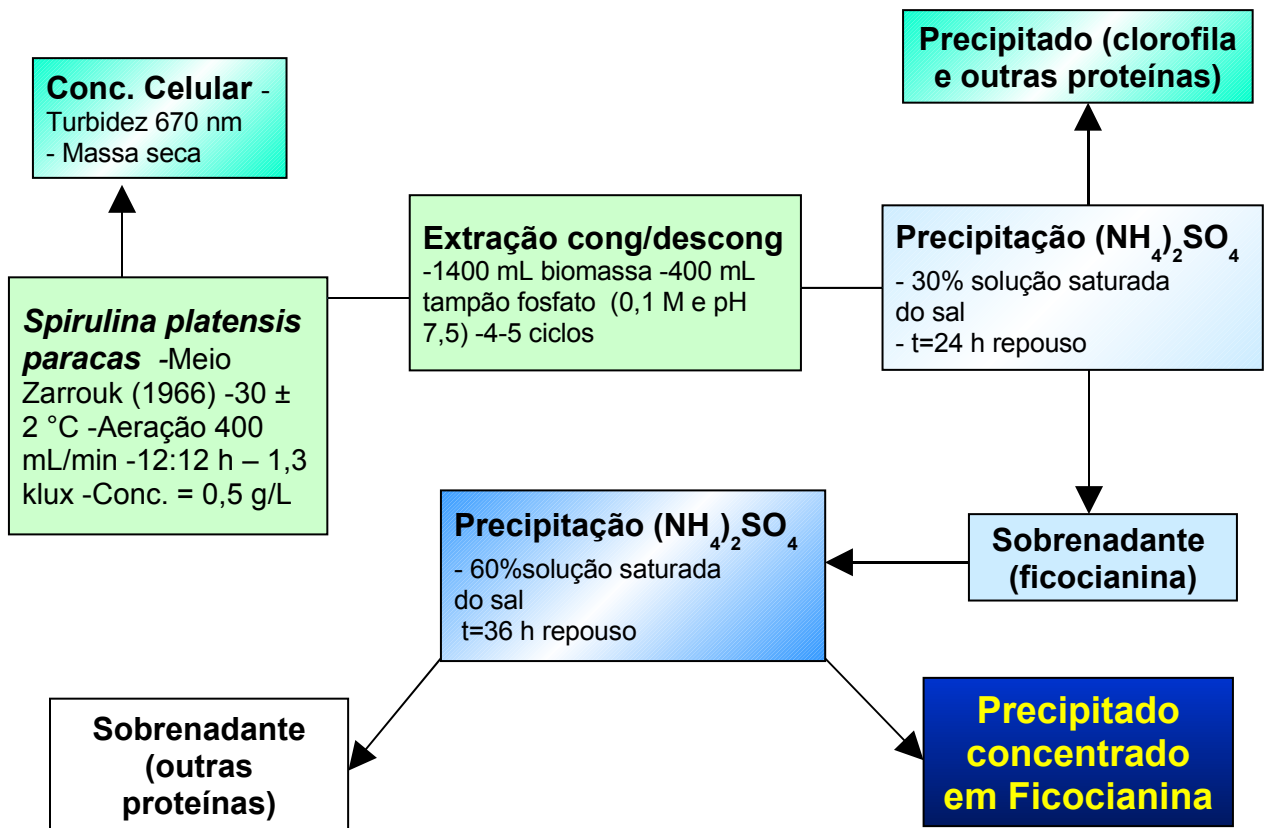


Figura 8 - Fluxograma dos passos de extração e recuperação de ficocianina.

A princípio realizou-se uma curva de precipitação de proteínas para verificar qual ou quais concentrações de sal  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eram as mais eficientes, analisando todas as proteínas e pigmentos envolvidos. Para isto uma solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi adicionada em diferentes volumes, a extratos brutos de ficocianina, para alcançar as porcentagens desejadas (20, 30, 40, 50, 60 e 70 %). Após 48 h em



repouso; em ausência de luz e a 4 °C, os precipitados foram obtidos por centrifugação a 9000 rpm (13583,7 x g) por 30 minutos e em seguida dissolvidos em 2 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=7,5) para leitura da absorbância.

Deste modo, com o conhecimento das porcentagens de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  necessárias para uma boa precipitação foram feitos passos de purificação, ou seja, precipitação por fracionamento. Obedecendo as condições antes descritas de temperatura e ausência de luz, como também posterior centrifugação, o extrato bruto de ficocianina foi precipitado por fracionamento com solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , primeiramente com 30% e finalmente com 60%. Para conseguir 30% de volume da solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , adicionou-se 172 mL da mesma solução deixando em repouso por 24 h. Centrifugou-se em condições controladas (ausência de luz e a 4 °C) e o precipitado dissolvido em 13,5 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=7,5) foi lido e descartado. Por sua vez, no sobrenadante foi acrescentado mais 430 mL da solução saturada de sal para atingir os 60% e deixado em repouso por 36 h. Por fim, todo o volume obtido até então foi centrifugado a 9000 rpm (13583,7 x g) por 30 minutos, onde o sobrenadante foi lido e descartado e o precipitado com alta concentração de ficocianina foi ressuspenso em 32 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH=7,5) para leitura no espectrofotômetro.

### Absorbância

Antes de todas as leituras em espectrofotômetro as amostras contendo misturas de pigmentos, células inteiras e rompidas foram centrifugadas, para que somente o sobrenadante, que contém pigmentos, fosse avaliado.

A medida de absorbância foi realizada em um intervalo de comprimentos de onda de 400-800 nm, utilizando-se espectrofotômetro Shimadzu, UV-1601PC (Kyoto, Japan), para a determinação da ficocianina em 620 nm (PIÑERO ESTRADA *et al.*, 2001; FURUKI *et al.*, 2003; MINKOVA *et al.*, 2003; SANTIAGO-SANTOS *et al.*, 2004; MADHYASTHA *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2005; PATIL *et al.*, 2006; SUN, WANG, QIAO, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2007) e de outros pigmentos, como a clorofila (430-440 nm e 660-680 nm), aloficocianina e ficoeritrina.

### Cálculo de Ficocianina e Aloficocianina

As concentrações de ficocianina e aloficocianina, de acordo com Bennett e Bogorad (1973), foram definidas como:

$$FC = \frac{Abs_{620} - 0,474(Abs_{652})}{5,34}$$

$$AFC = \frac{Abs_{652} - 0,208(Abs_{620})}{5,09}$$

onde:

FC = concentração de ficocianina (mg mL<sup>-1</sup>);

AFC = concentração de aloficocianina (mg mL<sup>-1</sup>);

Abs<sub>620</sub> = absorbância em 620 nm;

Abs<sub>652</sub> = absorbância em 652 nm.

Outros autores também utilizaram esta equação para calcular a concentração de ficocianina em microalgas, incluindo a *Spirulina platensis*, como: Abalde *et al.* (1998); Patel *et al.* (2005) e Silveira *et al.* (2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO ASSOCIADA À EXTRAÇÃO E PRODUÇÃO DE FICOCIANINA

A cinética de crescimento da *Spirulina platensis paracas* foi realizada com o objetivo de avaliar melhor a capacidade de crescimento celular da microalga no meio e condições de cultivo. Além disso, foi feito o estudo da extração de ficocianina juntamente com a cinética para entender como a produção de pigmento se comporta ao longo do cultivo.

O crescimento celular foi monitorado por 29 dias e os resultados encontrados estão representados na Figura 9. A determinação da biomassa foi feita pelo cálculo da concentração celular a partir da leitura da absorbância em 670 nm, utilizando a equação apresentada na seção 3.4 de Material e Métodos.

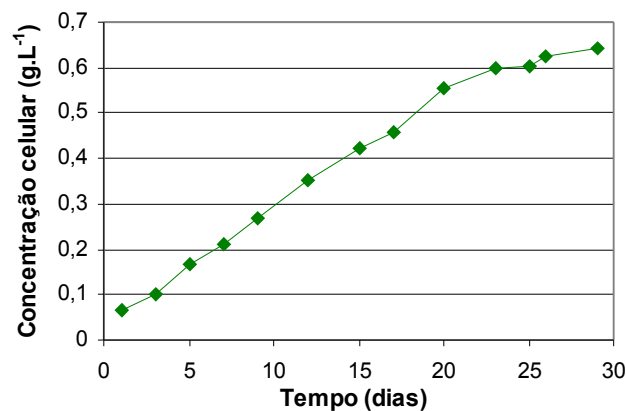


Figura 9 - Cinética de crescimento da *Spirulina platensis paracas* em meio Zarrouk.

O cultivo foi autotrófico e a concentração celular máxima encontrada, de acordo com a Figura 9, foi 0,641 g.L<sup>-1</sup> em 29 dias de cultivo. Vários autores reportaram maiores concentrações celulares, desde 10,6 g.L<sup>-1</sup> (CHEN e ZANG, 1997; CONVERTI *et al.*,

2006) até  $0,92 \text{ g.L}^{-1}$  (COSTA *et al.*, 2000; MULITERNO *et al.*, 2005; ANDRADE e COSTA, 2006; CHEN *et al.*, 2006; COLLA *et al.*, 2007), utilizando meios mixotróficos em batelada ou batelada alimentada, com adição de glicose ou acetato ou fontes de nitrogênio como o nitrato de sódio. Em cultivos autotróficos alguns autores obtiveram concentrações celulares que variam entre  $3,24 - 0,39 \text{ g.L}^{-1}$  (CHEN e ZANG, 1997; OLGUÍN, 2001; COSTA *et al.*, 2002; ONCEL e SUKAN, 2007), dependendo do tempo de cultivo, da intensidade de luz e do fotobiorreator empregados. Assim, a concentração celular obtida em nosso estudo ficou dentro do intervalo relatado pela literatura para cultivos autotróficos, mas é considerada baixa, já que se encontra próxima ao valor inferior. Entretanto, como já foi registrado na revisão bibliográfica desta dissertação, Vonshak *et al.* (1982) documentaram que concentração celular de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  é considerada ideal para a máxima eficiência fotossintética.

As curvas de velocidade específica de crescimento e crescimento logarítmico estão representadas na Figura 10. Os valores de concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foram utilizados para gerar modelos polinomiais com regressão e os dados de biomassa podem ser representados pela equação a seguir:

$$\text{Biomassa (g.L}^{-1}\text{)} = -2\text{E-}05t^3 + 0,0006t^2 + 0,0213t + 0,0408$$

onde:  $t$  corresponde ao tempo (em dias) de cultivo.

$$R^2 = 0,9981$$

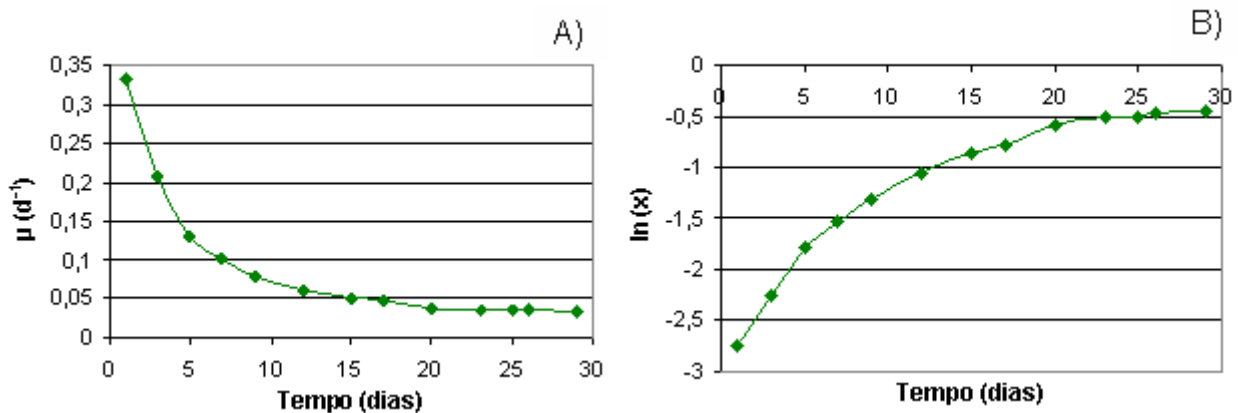


Figura 10 - A) Curva de velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), baseado na determinação da concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ); B) crescimento logarítmico ( $\ln(x)$ ) da concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em função do tempo.

Notou-se na Figura 10 (A) que a velocidade específica de crescimento começou no valor máximo de 0,33 e foi diminuindo até cerca de 0,03; mostrando que houve desaceleração do crescimento celular. Danesi *et al.* (2002) e Sánchez-Luna *et al.* (2004) obtiveram comportamento semelhante de velocidade específica de crescimento e de concentração celular, utilizando cultivo autotrófico em batelada e batelada alimentada com adição de fonte de nitrogênio.

Segundo os mesmos autores e ainda Ogbonna, Yada e Tanaka (1995), estes resultados sugeriram um efeito de sombreamento nos cultivos em ambos os regimes de alimentação e foi causado pela limitação de luz. Sabe-se também, que 80% das células ficam em completa ausência de luz por alguns instantes, quando a concentração celular atinge  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , como ocorreu na Figura 10. Desta forma, a luz pode ter sido um fator limitante, na geração da baixa velocidade específica de crescimento sem a diminuição da concentração celular (REINEHR e COSTA, 2006).

Não foi feito o cultivo em meio mixotrófico nem com adição de outras fontes de nitrogênio. As velocidades específicas de crescimento obtidas, no presente estudo, ficaram no intervalo de 0,33 a  $0,04 \text{ d}^{-1}$  e foram satisfatórias quando comparadas com dados da literatura para crescimento em condições autotróficas, que apresentaram valores de  $0,331\text{--}0,074 \text{ d}^{-1}$  (ANDRADE e COSTA, 2006; COLLA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2000; MULITERNO *et al.*, 2005; TRAVIESO *et al.*, 2001).

A produtividade foi constante, pois o crescimento celular se manteve praticamente linear até o 20º dia e alcançou valor de  $0,022 \text{ g.L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , estando no intervalo dos valores publicados por Reinehr e Costa (2006); Reinehr (2001); Travieso *et al.* (2001) e Sánchez-Luma (2004) de  $0,016\text{--}0,069 \text{ g.L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . O valor obtido em nosso estudo por cultivo autotrófico foi equivalente ao cultivo mixotrófico, que pela literatura é o que apresenta melhores resultados de produtividade.

A produção de ficocianina no cultivo autotrófico também foi investigada. Os valores de ficocianina encontrados e de concentração celular em cultivo autotrófico foram avaliados em 15 dias e estão graficados na Figura 11.

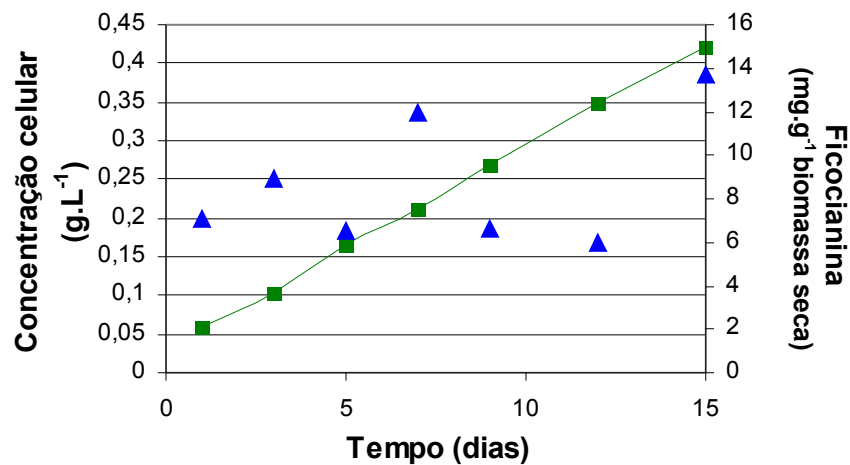


Figura 11 – Concentração celular (g.L<sup>-1</sup>) ■ ; e ficocianina (mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca) ▲ como função do tempo de cultivo.

A extração do pigmento foi feita, neste experimento, utilizando 10 mL de cultura de microalga, rompida em 4-5 ciclos de congelamento/descongelamento com 5 mL de tampão fosfato 0,1 M e pH 6,8.

Comparando as duas curvas da Figura 11, concentração celular e ficocianina, verificou-se que, apesar das oscilações na concentração de ficocianina ao longo dos dias, há uma quantidade máxima de ficocianina, quando a concentração celular também aumenta. Dessa forma, observou-se que a concentração de ficocianina extraída começou com 7,09 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca na concentração celular inicial de 0,06 g.L<sup>-1</sup> e alcançou valor máximo no último ponto com 13,69 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, equivalente a maior concentração celular de 0,421 g.L<sup>-1</sup> conseguida no 15º dia de cultivo avaliado. Esse aumento está em concordância com o que foi registrado por Soni *et al.* (2006) e por Zhang X-M, Zhang Y-M e Chen (1999), indicando que a produção de ficocianina está total ou parcialmente associada ao crescimento celular. Além disso, Olaizola e Duerr (1990) relataram a possível habilidade das células da *S. platensis* de regular sua eficiência fotossintética alterando a quantidade de pigmentos, por isso a variação dos valores de ficocianina.

Quando comparado com a literatura, o valor máximo de ficocianina (13,69 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca) obtido na maior concentração celular de *Spirulina platensis*, estava abaixo dos publicados por Chen *et al.* (2006) e Sarada, Pillai e

Ravishankar (1999), que foram de  $140 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $190 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, respectivamente, com extração por congelamento/descongelamento. Mas outros autores descreveram valores mais próximos de ficocianina ( $23,7 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $46 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca), estudando rompimento celular por choque osmótico com sulfato de amônio e acetato, respectivamente (NUI *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007). E ainda, Santiago-Santos *et al.* (2004) e Soni *et al.* (2006), reportaram valores menores de ficocianina ( $0,5$  e  $2 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca), que o encontrado em nosso estudo, utilizando outras microalgas, como *Calothrix sp.* e *Oscillatoria quadripunctulata*. Deste modo concluiu-se que a extração de ficocianina da *Spirulina platensis*, não foi satisfatória para um cultivo autotrófico com rompimento celular por congelamento/descongelamento, mas foi suficiente para verificar o comportamento do pigmento fotossintético com o crescimento celular.

#### 4.2 PRECIPITAÇÃO DE BIOMASSA

Estudos de precipitação de biomassa foram realizados com o objetivo de obter uma massa de microalga sem o auxílio da filtração. Para tanto, diferentes pHs e concentrações de sal foram testados.

A precipitação de suspensão de células sem tratamento pode ser verificada na Figura 12 (A), tubo 1. Observou-se um precipitado de aproximadamente  $0,7 \text{ cm}$  de biomassa, mas ainda com muitas células ao longo do tubo de ensaio. Isto ocorreu, pois alguns grupos microalgais apresentam adaptações (vacúolos de gás) que lhes permitem regular sua posição na zona fótica, além de impedirem sua precipitação. É importante ressaltar que estes organismos, embora microscópicos, possuem densidade ligeiramente superior a da água e, por este motivo, surgiram adaptações que impedissem ou reduzissem sua precipitação.

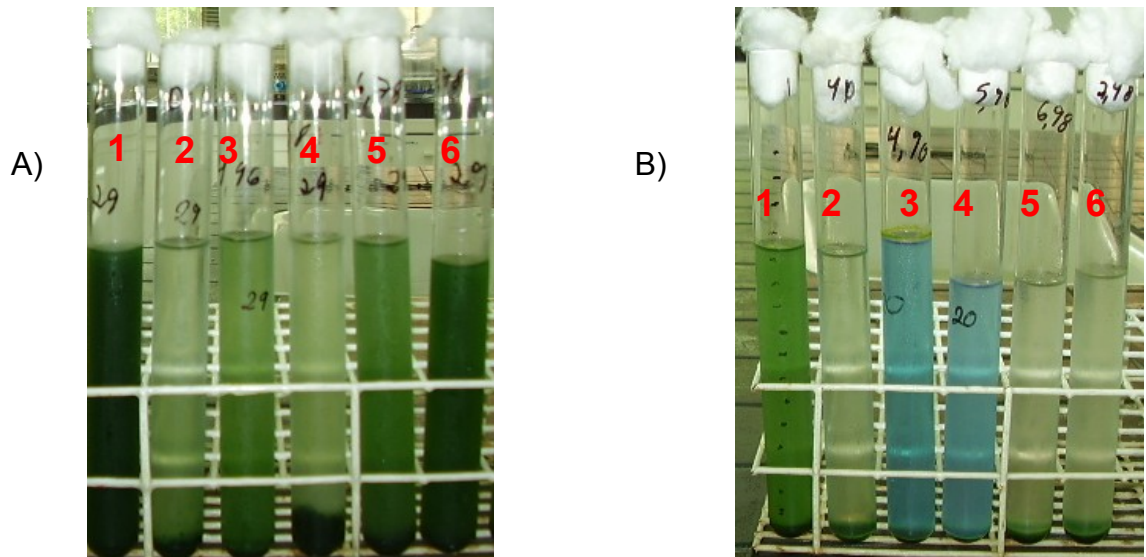


Figura 12 - Testes de precipitação sem tratamento e com ajuste de pHs, observado após: A) 24 h e B) 168 h (uma semana). Da esquerda para a direita: tubo 1, sem tratamento; tubo 2, diluído em 50% ; tubo 3, ajustado em pH 5,0; tubo 4, ajustado em pH 5,9; tubo 5, ajustado em pH 6,8; e tubo 6, ajustado em pH 7,8.

A precipitação de suspensão celular diluída a 50% com água destilada, ilustrada na Figura 12 (A), tubo 2, foi feita pela adição de 15 ml de cultura a 15 ml de água destilada, seguida de homogeneização e repouso. Após 2 h, conseguiu-se um precipitado de 0,7 cm e poucas células ao longo do tubo. Depois de 168 h, (B), a precipitação foi total, isto é, todas as células da microalga decantaram, pois com a adição de água a densidade do meio diminuiu e assim as células da microalga precipitaram com maior facilidade.

Na Figura 12 (B), observou-se que a suspensão de células sem tratamento, após 168 h, apresentou pequena mudança, isto é, pouca precipitação. Comparando os pHs 6,8 e 7,8 após 24 h, (A), e após 168 h, (B), observou-se melhora significativa na precipitação de células. A princípio a decantação foi insatisfatória, isto é, houve pouca precipitação, com muitas células ao longo do tubo de ensaio. No entanto, os resultados após uma semana indicaram que a lenta precipitação ocorreu em conjunto com outras mudanças, onde todos os tubos apresentaram sedimento e sobrenadante límpido, mas os testes com os pHs 5 e 5,9 tiveram um sobrenadante azulado, evidência do rompimento de células de *Spirulina*.



Verificou-se ainda que, para pHs mais altos, a decantação ocorreu com boa eficiência e sem rompimento celular. Portanto, quanto mais baixo for ajustado o pH melhor a precipitação das células da microalga nas primeiras horas, mas após algum tempo ocorre rompimento celular, o que não é interessante nesta etapa. Essa ruptura celular pode ser justificada pelas alterações conformacionais significativas em forças iônicas elevadas ocasionadas pelos pHs 5 e 5,9, o que não ocorreu com os outros testes sugerindo que a estrutura da microalga foi preservada (LIMA e MASINI, 1999).

O cultivo diluído em 50% em volume de água destilada foi o melhor resultado de precipitação. Deste modo, este solvente foi utilizado para todas as etapas que necessitaram de precipitação de biomassa.

Foram examinadas ainda, as precipitações em diferentes concentrações de sal de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ilustradas na Figura 13.

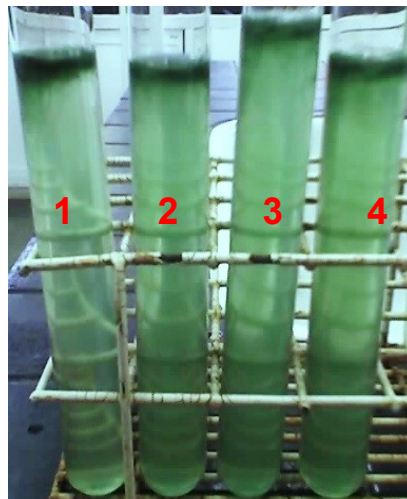


Figura 13 - Testes de precipitação com tratamento em diferentes concentrações de sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  observado após 48 h. Da esquerda para a direita: tubo 1 (100 mM), tubo 2 (50 mM), tubo 3 (20 mM) e tubo 4 (10 mM).

Após 48 h (armazenados a 8 °C) ocorreu floculação e flotação parcial, com concentração celular na superfície de todos os tubos de ensaio de aproximadamente 0,5 cm. Entretanto algumas células permaneceram ao longo dos tubos, pois as populações de *Spirulina* possuem cadeias e comprimentos diversos e assim velocidades diferentes, resultando em uma fronteira de separação difusa.

Mesmo, neste experimento, não ocorrendo precipitação celular, o objetivo de separação da biomassa do meio de cultivo foi alcançado através da flotação celular a partir da adição do sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Para uma melhor precipitação de suspensão de microalga *Spirulina platensis*, a diluição de 50% de volume de água destilada se mostrou satisfatória. Foi observado em outros experimentos, que maior diluição ocasiona melhor decantação, mas há o risco do rompimento celular, pois como o pH do meio Zarrouk padrão é alcalino, entre 9 e 10, com adição de água, o meio torna-se hipotônico. Em função desta pressão osmótica a lise celular foi facilitada. Isto está de acordo com o que foi observado nos experimentos com ajuste de pH em 5,0 e 5,9, pois houve boa precipitação, mas ocorreu também o rompimento das células da microalga.

Os resultados obtidos na precipitação foram qualitativos, pois não foi possível estimar os pHs ideais, bem como a velocidade de precipitação ou flotação, devido aos vacúolos de gás da microalga e a diferentes comprimentos das células. Não se definiu também, o tempo de decantação em diferentes condições, devido à fronteira difusa de separação, que dificulta as medidas; por outro lado, pôde-se determinar o tratamento para o qual a precipitação foi mais eficiente.

#### 4.3 ISOLAMENTO DA MICROALGA *SPIRULINA PLATENSIS* E TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Contaminantes em cultivos de *Spirulina platensis* sempre existiram, mesmo porque as grandes produções de biomassa desta microalga são feitas em lagos ou tanques abertos, sem a preocupação com contaminação proveniente do meio ambiente ou de outras fontes. Mas dependendo da finalidade (cosmético, alimentício e farmacêutico), os cultivos e o manejo da microalga e de seus compostos merecem certa esterilidade.

Para avaliar a possibilidade de se obter culturas puras, houve tentativas de isolamento da microalga *Spirulina platensis*, por inúmeros problemas encontrados na cinética da mesma, que poderiam provir de contaminantes. Além disso, essas

contaminações, na maioria das vezes bactérias, poderiam atrapalhar a microalga na assimilação de componentes importantes para o seu crescimento, atingindo sua composição química.

Na Figura 14 verificou-se o crescimento da microalga *Spirulina platensis* em dois períodos diferentes.

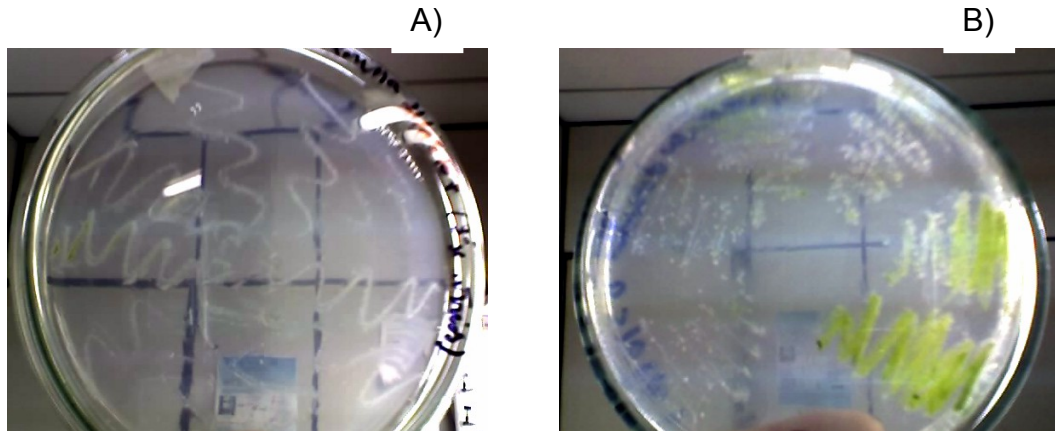


Figura 14 - Crescimento da *Spirulina platensis* em meio sólido, inoculada por estrias; A) 2 dias de cultivo; B) 8 dias de cultivo.

Observou-se na Figura 14 (A) que as estrias estão esbranquiçadas após 2 dias de cultivo, isso significa que a contaminação (bactérias) cresceu, mas a microalga ainda não se desenvolveu visivelmente neste período. Após 8 dias (B) há estrias verdes, correspondendo ao crescimento da microalga. Verificou-se então que, como as contaminações têm o período de reprodução/crescimento muito mais acelerado que a microalga, a *Spirulina platensis* cresceu sobre os contaminantes, dificultando a redução e/ou eliminação dos mesmos.

Insistindo na tentativa de purificação, foram feitos testes para tentar isolar a microalga, transferindo uma pequena quantidade de *Spirulina* de uma placa de Petri para outra, mas o que se obteve no final foi o isolamento do contaminante e não do microrganismo de interesse.

Em outra estratégia de axenização, experimentos com antibióticos foram realizados para verificar a sensibilidade ou resistência da *Spirulina platensis* aos mesmos. Dentre os 10 antibióticos testados (Amoxicilina 10 mcg, Cloranfenicol 30 mcg,

Penicilina 10 mcg, Ampicilina 10 mcg, Gentamicina 10 mcg, Cefalexina 30 mcg, Amicacina 30 mcg, Tetraciclina 30 mcg, Norfloxacin 10 mcg e Oxacilina 0,1 mcg) observou-se que a cianobactéria teve crescimento sobre os discos de todos os antibióticos menos do cloranfenicol. Isto pode ter ocorrido por três fatores: o primeiro, a microalga pode ser resistente a esses antibióticos; segundo, a concentração pode ter sido baixa e, terceiro, devido ao crescimento lento da *Spirulina platensis*, os antibióticos podem ter perdido sua carga.

Cao *et al.* (1999), publicaram um estudo sobre a sensibilidade da cianobactéria *Spirulina platensis* a 6 antibióticos (Canamicina, Neomicina, Geneticina, Ampicilina, Cloranfenicol e Higromicina) e um herbicida (L-fosfinotricina) e verificaram que a microalga foi resistente a Canamicina, Neomicina, Geneticina e Ampicilina. Isto veio ao encontro com os resultados do nosso estudo, pois a *Spirulina platensis* pareceu ser resistente a Ampicilina e sensível ao Cloranfenicol. Em outros experimentos realizados constatou-se que o Cloranfenicol, mesmo em concentrações baixas, é tóxico tanto para a microalga como também para os contaminantes. Por isso, este antibiótico não é o mais indicado, pois se pretendeu encontrar um em que a *Spirulina platensis* fosse resistente, mas que o antibiótico eliminasse ou reduzisse a contaminação. Logo, em cultivos com adição de antibióticos, o crescimento da microalga comparado com o controle sem adição, foi inibido, em maior ou menor grau, indicando que experimentos com antibióticos são tóxicos para a *Spirulina platensis*. Portanto, mais estudos devem ser realizados para verificar a influência dos antibióticos na microalga.

#### 4.4EXTRAÇÃO DE FICOCIANINA

A extração de ficocianina a partir da *Spirulina platensis* envolve rompimento celular por choque osmótico, com tampão fosfato, seguido de congelamento/descongelamento e extração mecânica utilizando *French press* ou o homogeneizador de alta pressão.

#### 4.4.1 Extração por Congelamento / Descongelamento

O método de extração por congelamento/descongelamento tem algumas desvantagens como: o tempo relativamente grande para que ocorra o rompimento celular e o consumo de energia para o congelamento e/ou descongelamento. Em contrapartida, as vantagens sobressaem como: boa eficiência na ruptura celular, reprodutibilidade, utilização de equipamentos de fácil manipulação e a praticidade do método. Este mecanismo de rompimento celular é causado pelo inchaço das células e finalmente ruptura, devido aos cristais de gelo agindo como facas afiadas durante o processo de congelamento e a contração das células no descongelamento (SONI *et al.*, 2006). Além disso, há também a contribuição no rompimento pelo choque osmótico provocado pela adição de tampão fosfato ou água.

A seguir encontra-se a Figura 15 que representa os números de ciclos de congelamento/descongelamento feitos em água destilada a fim de verificar quantos ciclos são necessários para que se tenha maior quantidade de ficocianina extraída. A concentração celular do cultivo usado para este experimento foi de  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ .

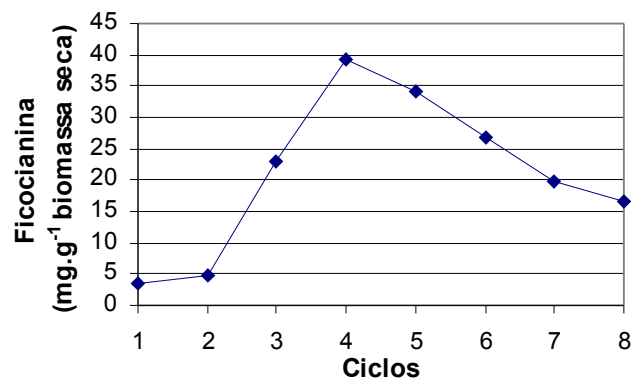


Figura 15 - Curva de ficocianina de *Spirulina platensis* obtida por congelamento/descongelamento no total de 8 ciclos.

Verificou-se na Figura 15 que os pontos a partir do primeiro ciclo de congelamento/descongelamento até o quarto são crescentes, atingindo o seu máximo

em 39,33 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, de ficocianina extraída. Depois do máximo, no ponto do quarto ciclo (4x), os próximos pontos são decrescentes até atingir o ponto de oito ciclos (8x) com o valor de ficocianina de 16,49 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca. Essa queda pode ser explicada por Silveira *et al.* (2007), que relataram que perto do ponto isoeletrico as interações das proteínas em água diminuem, reduzindo a extração. Observou-se ainda uma tendência de constância entre os pontos sete e oito ciclos, indicando que a extração de ficocianina estava estabilizando.

Abalde *et al.* (1998) e Silveira *et al.* (2007) também mostraram estudos envolvendo extração de ficocianina com água destilada: o primeiro autor utilizou congelamento/descongelamento e o segundo apenas choque osmótico monitorado por 24 h e relataram resultados expressivos. Portanto, concluíram que água pode ser uma alternativa para a extração de pigmentos, pois produz alta concentração de ficocianina, além de ter baixo custo e a possibilidade de escalonamento.

Sabendo que quatro ciclos são suficientes para um rompimento celular satisfatório, ou seja, boa quantidade de ficocianina extraída, procedeu-se o estudo utilizando quatro a cinco ciclos de congelamento/descongelamento, mas em solvente diferente.

O solvente testado foi o tampão fosfato (0,1 M) em três diferentes pHs. Dentre os pHs de tampão fosfato usados para o rompimento celular, o pH 7,5 foi o que obteve maior quantidade de ficocianina igual a 27,8 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca e o segundo melhor foi o pH 6,1 com 12,75 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca. O tampão ajuda na lise celular, pois o meio externo está menos concentrado que o interno, fazendo com que as células absorvam água e inchem até o rompimento. Através do processo de congelamento/descongelamento em sucessivos ciclos, essa extração foi acelerada e mais eficiente. Outro papel importante do tampão é manter o pH desejado, impedindo variações que possam prejudicar as proteínas extraídas. Estudos de estabilidade de ficocianina por um período de quatro semanas indicaram que, o pigmento foi estável na faixa de pH 5-7,5 na temperatura ambiente de 25 ± 2 °C e em menores de 9 ± 1 °C. E que ainda, em temperaturas baixas, a ficocianina permaneceu estável por longos períodos e abaixo e acima do intervalo de pHs 5-7,5 o pigmento perdeu sua cor gradualmente (SARADA, PILLAI e RAVISHANKAR, 1999).

Minkova *et al.* (2003), Sarada, Pillai e Ravishankar (1999) e Silveira *et al.* (2007), usaram para o rompimento celular tampão fosfato em pHs próximos ou iguais a 7,5; seguido ou não de congelamento/descongelamento, e relataram valores maiores ( $105 \text{ mg.g}^{-1}$  a  $190 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca) que os encontrados em nosso estudo. Mas deve-se observar os números de ciclos de congelamento/descongelamento utilizados pelos autores e também o tempo de digestão das células com o fosfato, pois alterando esses parâmetros pode-se obter resultados completamente diferentes.

Comparando os resultados em quatro ciclos de congelamento/descongelamento utilizando água (Figura 15) e tampão fosfato em  $\text{pH}=7,5$  ( $39,33 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $27,8 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca), respectivamente, observou-se que o valor de ficocianina extraída utilizando água foi maior. Este solvente poderia ter sido utilizado para os próximos experimentos com rompimento celular, mas foi escolhido o tampão fosfato  $\text{pH}= 7,5$ , pois desta forma o pH da amostra seria mais facilmente controlado sem comprometer o pigmento.

#### 4.4.2 Extração Mecânica

A extração mecânica por *French press* é um método de rompimento celular onde a amostra passa por um pequeno orifício sob pressão. Dependendo da pressão exercida do equipamento sobre as células da microalga a serem rompidas, tem-se maior ou menor eficiência do equipamento em se tratando de extração de pigmentos. Entretanto, há pouca reprodutibilidade, pois as amostras estão sob alta pressão e isto requer mais habilidade e experiência do operador do equipamento, quando comparado com a sonicação, por exemplo. Mas este último método também não oferece garantias para uma boa extração, já que resulta na perda da cor e fluorescência da proteína (SONI *et al.*, 2006; VISKARI e COLYER, 2003). Contudo, o método mecânico de rompimento celular por *French press* foi feito para fins comparativos, isto para escala laboratorial, pois se o objetivo for aumentar a produção e extração de pigmentos, este método torna-se inviável.

A evolução da extração de ficocianina por *French press* em diferentes pressões está representada na Figura 16.

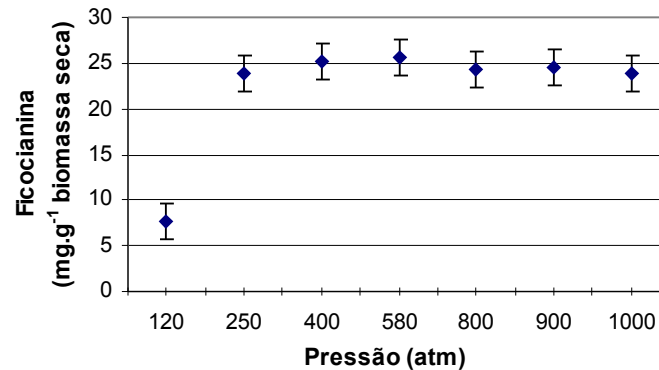


Figura 16 – Ficocianina (mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca) em função da pressão exercida no *French press*.

Verificou-se na Figura 16, que há um aumento no valor de ficocianina, de 7,7 mg.g<sup>-1</sup> para 23,91 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, quando se analisa as pressões 120 atm e 250 atm, respectivamente, e que nas pressões seguintes as quantidades de ficocianina permanecem praticamente constantes. Constata-se, portanto, que na pressão 250 atm houve rompimento celular, mas não tão agressivo a ponto de desintegrar todas as células da microalga, como ocorreu nas outras pressões.

Não se pode deixar de questionar os valores relativamente baixos de ficocianina. Conforme investigaram Sarada, Pillai e Ravishankar (1999), a qualidade e quantidade de ficocianina são influenciadas pela seleção do método adequado de extração. Ou seja, métodos de extração como o congelamento e descongelamento mostram apenas um pico de absorção de ficocianina, enquanto que extração por homogeneização (gral/pistilo) e *French press*, por exemplo, apontam mais outros dois picos em 680 e 430 nm (ANEXO 2), indicando a contaminação de clorofila ocasionada pela desintegração das células da microalga. Fukui *et al.* (2004) e Lumry e Eyring (1954), estudaram as mudanças na conformação de proteínas e verificaram que altas pressões exercidas nas células da microalga podem provocar uma mudança na conformação da proteína e esta mudança pode levar à desnaturação. Isto pode ter



ocorrido neste estudo, onde o extrato bruto apresentou visualmente coloração verde referente a clorofila e por espectrofotômetro, altos valores de absorbância nos comprimentos de onda da clorofila e baixo valor no comprimento de onda da ficocianina em 620 nm.

Observou-se ainda que o maior valor de ficocianina obtido foi de  $25,62 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca na pressão 580 atm, valor próximo ao documentado por Niu *et al.* (2007) de  $26 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, que utilizaram a sonicação para o rompimento celular e bem acima do valor reportado por Santiago-Santos *et al.* (2004) e Soni *et al.* (2006) de  $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $2 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, respectivamente, que utilizaram para os rompimentos as microalgas *Calothrix sp.* e *Oscillatoria quadripunctulata*. Em contra partida, Chen *et al.* (2006), encontraram valor maior, de  $140,5 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, usando a sonicação para o rompimento de uma cultura de *Spirulina platensis* enriquecida com selênio. Desta forma, deve-se levar em conta não somente o método adotado para o rompimento celular, como também o meio e condições de cultivo, ou seja, adição de carbono orgânico e intensidade de luz administrados. Sendo assim, os valores publicados por esses autores devem servir apenas como consulta de dados, respeitando as condições empregadas, e não como um alvo do processo. Outro método de extração mecânica testado foi a homogeneização por pressão, que como o método anterior possui grande eficiência, mas neste caso pode ser utilizado para processo de escalonamento. A Figura 17 ilustra o rompimento celular ocasionado pela homogeneização em nove diferentes pressões.

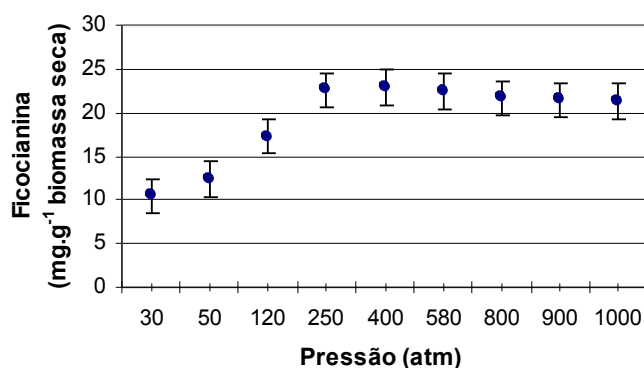


Figura 17 – Ficocianina ( $\text{mg.g}^{-1}$  biomassa seca) em função da pressão exercida no homogeneizador de alta pressão.

Analisando a Figura 17, nota-se que há um crescente aumento nos valores de ficocianina entre as pressões 30 e 250 atm, indicando que ocorreu uma melhor ruptura celular e, assim, uma maior extração de pigmento. Os valores de ficocianina permaneceram muito semelhantes a partir de 250 atm e com tendência de estabilidade, significando, como já foi descrito anteriormente no método de extração por *French press*, que houve nas outras pressões não somente o rompimento como também a desintegração das células da microalga, ou seja, as enzimas e as organelas da microalga não são protegidas e todo o material celular fica no extrato. Isto também pode ser verificado pela análise microscópica feita nas pressões 30, 50, 120 e 250 atm, apresentadas na Figura 18.

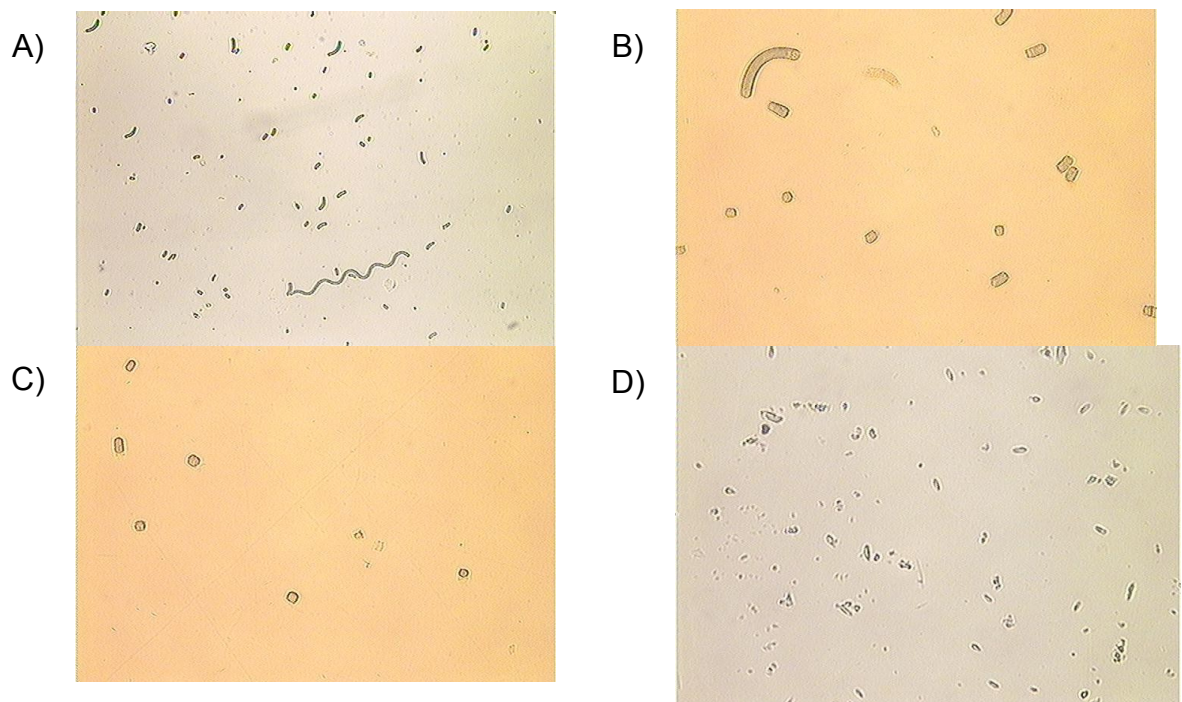


Figura 18 - Células de *Spirulina platensis*, vistas ao microscópio, rompidas pelo homogeneizador nas pressões: A) 30 atm (100x), B) 50 atm (400x), C) 120 atm (400x) e D) 250 atm (400x).

As imagens da Figura 18 são de um rompimento celular feito em homogeneizador de alta pressão. A 30 atm se observou poucas espiras intactas e uma grande quantidade de fragmentos celulares; partir de 50 atm observou-se grande

alteração do aspecto, com grupos de poucas células, e algumas isoladas; a 120 atm notaram-se muitas células dissociadas e nenhuma espora e a 250 atm encontraram-se fragmentos visíveis apenas na imagem aumentada em 400 vezes; a partir deste aumento não se observou mais fragmentos microalgais. Sendo assim, foi obtido um extrato bruto muito semelhante ao do método de extração por *French press*, incluindo quantidade de ficocianina e de aspectos macro e microscópios.

Em nosso estudo a máxima quantidade de ficocianina alcançada, no homogeneizador de alta pressão, foi de 22,92 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca na pressão de 400 atm, verificando-se um valor abaixo daquele encontrado por Chen *et al.* (2006), 140,5 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, e Nui *et al.* (2007), 26 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, que também estudaram a extração mecânica, mas utilizando sonicação.

Desta maneira, pode-se dizer que o rompimento celular realizado pela homogeneização por pressão foi bastante eficiente (no sentido de que rompeu as células), mas forneceu valores baixos de ficocianina, que podem estar relacionados com a mudança na conformação da proteína podendo gerar desnaturação relacionada com as pressões aplicadas nas células, mesmo sendo de algumas atmosferas (FUKUI *et al.*, 2004; LUMRY e EYRING, 1954).

Um terceiro ensaio de rompimento celular com congelamento/descongelamento foi feito com a mesma amostra utilizada em homogeneizadores, para verificar a eficiência dos métodos de extração mecânica e também a influência da clorofila nos resultados finais destes processos. O rompimento celular foi feito com 5 ciclos de congelamento/ descongelamento em - 26 °C e 25 °C, respectivamente, utilizando para isso 4 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH 7,5) em 10 mL de microalga *Spirulina platensis*. Uma amostra com concentração celular de 0,5 g.L<sup>-1</sup> foi usada para os três métodos de extração celular e os valores de ficocianina encontram-se na Tabela 7, a seguir.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DE FICOCIANINA OBTIDAS POR: *FRENCH PRESS*, HOMOGENEIZAÇÃO POR PRESSÃO E CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO

Métodos de extração celular	Concentrações de ficocianina (mg.g <sup>-1</sup> biomassa seca)
<i>French press</i>	25,62
Homogeneizador de alta pressão	22,92
Congelamento / descongelamento	126

Através da Tabela 7, verificou-se que, a concentração de ficocianina 126 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca obtida por congelamento/descongelamento foi muito superior às alcançadas pelos métodos de *French press* e homogeneização de alta pressão, 25,62 mg.g<sup>-1</sup> e 22,92 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, respectivamente. O valor de ficocianina alcançado por congelamento/descongelamento está muito próximo dos melhores valores encontrados na literatura. Os autores Minkova *et al.* (2003), Niu *et al.* (2007) e Sarada, Pillai e Ravishankar (1999) estudaram a microalga *Spirulina platensis* e o rompimento celular por congelamento/descongelamento e publicaram valores entre 23,7-190 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, deste modo, a nossa quantidade de ficocianina obtida esta dentro do intervalo apresentado. Desta forma, pode-se dizer que, comparando os valores de ficocianina do extrato bruto dos métodos aplicados para o rompimento celular no presente estudo, e os valores obtidos na literatura, concluiu-se que o método de congelamento/ descongelamento realizado neste trabalho conseguiu uma boa quantidade de ficocianina por cada grama de biomassa seca.

Comparando ainda, os três métodos de ruptura celular quanto a influência da contaminação de clorofila no extrato, verificou-se que na leitura de absorbância (ANEXO 2) entre 400 e 800 nm do método congelamento/descongelamento, não houve um pico significativo no comprimento de onda referente ao pigmento clorofila, somente um pico alcançando maior valor em 620 nm, relativo a ficocianina. Neste sentido, pode-se explicar que, o que ocorreu no método de congelamento/descongelamento foi o rompimento celular provocado por dois processos: choque osmótico pela adição de tampão fosfato e os cristais de gelo durante o congelamento seguido da contração celular no descongelamento. Portanto, constatou-se que este método é menos

agressivo, quando comparado com os outros dois métodos de ruptura celular, isto é, protege as enzimas e as organelas da microalga, sem deixar de ser eficiente (LORETO *et al.*, 2003; VISKARI e COLYER, 2003; FELIPE e BERMEJO, 2006).

#### 4.5PURIFICAÇÃO

A precipitação do extrato bruto com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  é um passo de purificação, pois além de concentrar a ficocianina também pode diminuir as quantidades dos outros pigmentos (como aloficocianina, ficoeritrina e clorofila) e de outras proteínas, que acabam interferindo na pureza da ficocianina. Esta pureza, por sua vez, em geral, é medida pela razão  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$ , e através dos valores obtidos sabe-se a qualidade da ficocianina como também com que finalidade pode ser aplicada.

Desta forma, curvas de precipitação de proteínas e ficocianina (Figura 19) foram desenvolvidas a fim de analisar o comportamento, ou seja, a eficiência da precipitação de acordo com as porcentagens de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

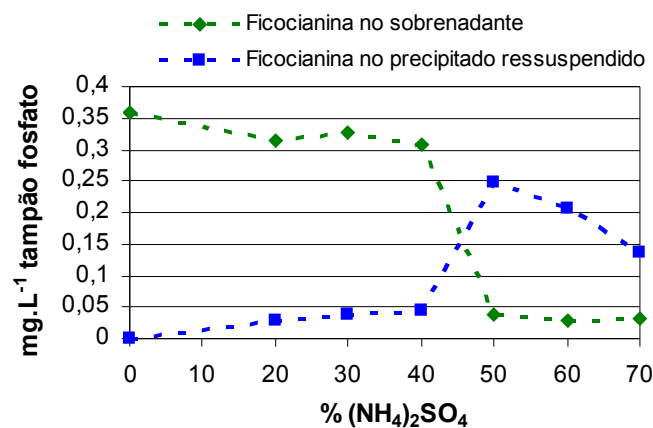


Figura 19 - Curvas de ficocianina no sobrenadante e ficocianina no precipitado ressuspendido em função de diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Na mesma Figura 19, verificou-se que com a crescente adição de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  houve um aumento de ficocianina no precipitado ressuspendido, até atingir um máximo para 50% de precipitante, e uma diminuição de ficocianina no sobrenadante, até a estabilidade. Deste modo, observou-se que há um limite de adição de sal e que ainda em 60 e 70% existiu uma constância na curva “Ficocianina no sobrenadante”, indicando que não ocorreu mais precipitação das mesmas, mas uma perda de ficocianina na curva “Ficocianina no precipitado ressuspendido”. Essa perda pode ter acontecido na manipulação do método analítico e não é grave, já que o objetivo em descobrir qual seria a máxima porcentagem de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi alcançada. Os espectros de absorção dos precipitados nas porcentagens 20, 30 e 40% de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  também foram analisados (ANEXO 3) e mostraram valores de máximo em 438, 680 e 280 nm, confirmando a presença de clorofila e de outras proteínas. Com a adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 20 para 40%, ocorreu também um aumento nos valores de clorofila e de outras proteínas, ou seja, a precipitação foi eficiente na diminuição e/ou eliminação destes contaminantes para a obtenção posterior de ficocianina com maior pureza.

Para a precipitação foi utilizado extrato bruto obtido por congelamento/descongelamento, apresentando concentração de ficocianina de  $4,47 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca e pureza de 0,88 ( $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$ ). Após precipitação com 50% de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  passou a ter  $3,08 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca e pureza de 1, ou seja, uma recuperação de 69%. De acordo com Patel *et al.* (2005), que empregaram esse procedimento de precipitação para a purificação de ficocianina a partir da *Spirulina platensis*, e os autores Soni *et al.* (2006) com a cianobactéria *Oscillatoria quadripunctulata*, essa recuperação de 69% é adequada para uma simples precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Analisando ainda, a razão  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$ , observou-se que o aumento no pico de 620 nm está relacionado com a absorbância máxima de ficocianina, enquanto ocorreu uma diminuição na absorbância em 280 nm, justificada pela remoção de outras proteínas e pigmentos da solução de ficocianina.

Deste modo, sabendo que em concentrações menores de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  houve precipitação de contaminantes, que interferem na qualidade de ficocianina, e que em concentrações maiores ocorreu a precipitação de ficocianina, determinou-se uma precipitação por fracionamento com solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Utilizou-se, para a

obtenção do extrato bruto de ficocianina, um volume de 1400 mL de cultivo de *Spirulina platensis* com concentração celular de  $0,52 \text{ g.L}^{-1}$  que foi submetido ao processo de ruptura celular em 5 ciclos de congelamento/descongelamento, com 400 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH 7,5).

O extrato bruto de ficocianina foi precipitado por fracionamento com solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , primeiramente com 30% e finalmente com 60%.

Todos os passos de extração e precipitação foram acompanhados por análise em espectrofotômetro para a determinação da concentração de ficocianina em cada passo, de aloficocianina como também a pureza do pigmento-proteína de interesse.

Após rompimento celular e extração de pigmento o extrato bruto foi avaliado e a quantidade de ficocianina encontrada foi de  $85,53 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, com uma taxa de pureza, ou seja,  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$ , igual a 0,78, indicando que muitas outras proteínas estavam presentes, além da ficocianina. Em seguida, com precipitação de 30% em volume de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a quantidade de ficocianina que precipitou foi pequena de  $1,84 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca e permaneceu no sobrenadante  $83,43 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca com  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$  igual a 1,35, evidenciando a remoção dos outros pigmentos que não eram de interesse. Posteriormente, a precipitação de 60% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi realizada e indicou uma quantidade de ficocianina no sobrenadante de  $0,55 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, ou seja, boa parte do pigmento de interesse foi precipitado e medido, este valor encontrado foi de  $30,67 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca com pureza de 2,09. Verificou-se que a razão entre as absorbâncias ( $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$ ) foi gradativamente aumentando com a taxa de pureza no último passo igual a 2, sugerindo que essa ficocianina pode ser utilizada nas indústrias de alimentos e cosméticos. Patel *et al.* (2005) encontraram valores parecidos de  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$  de 0,82 com 25% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 2,66 com 50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , concluindo que esta relação  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$  igual a 2, foi considerada boa para precipitação final com 60% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

O fator de separação expresso por  $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{652}$ , determina a taxa de separação entre a ficocianina (620 nm) e a aloficocianina (652 nm), portanto quanto maior for esta relação menor será a contaminação por aloficocianina, obtendo uma ficocianina de maior pureza. Mas o que se observou foi que, em altas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aconteceu a precipitação de ficocianina, mas também de outras proteínas e de aloficocianina. Mesmo com a precipitação fracionada, não se conseguiu uma

separação satisfatória dessas duas moléculas. De acordo com Patel *et al.* (2005), Minkova *et al.* (2003), Reis *et al.* (1998), Soni *et al.* (2006), entre outros autores, a separação de ficocianina e aloficocianina só é alcançada com a união de outros passos de purificação como: ultrafiltração, métodos cromatográficos, entre outros.

Abalde *et al.* (1998) e Patel *et al.* (2005) relataram que, se a quantidade de ficoeritrina for considerada muito pequena, esta molécula não interfere na purificação do processo. Sendo assim, a proteína total encontrada no extrato bruto foi de 116,47 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca, incluindo 73,7% de ficocianina com 85,83 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca e 26,3% de aloficocianina com 30,64 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca e com as precipitações conseguiu-se 30,67 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca de ficocianina com pureza ( $Abs_{620}/Abs_{280}$ ) de 2. Os autores Niu *et al.* (2007), com *Spirulina platensis*, conseguiram valores próximos de ficocianina e de taxa de pureza, aproximadamente 31 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca e 2,8, respectivamente. Outros autores como Minkova *et al.* (2003), relataram quantidade de ficocianina maior (160 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca), porém com uma taxa de pureza menor e igual a 0,95. E ainda, Soni *et al.* (2006), com *Oscillatoria quadripunctulata*, conseguiram valores menores de ficocianina, entretanto, com alta pureza 3,31. Os últimos autores utilizaram técnicas de purificação como cromatografia de troca iônica, juntamente com outras, para obterem esses resultados. Como em nosso estudo trabalhamos apenas com um passo de purificação, isto é, a precipitação por fracionamento com solução saturada de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, os resultados obtidos de pureza ( $Abs_{620}/Abs_{280}= 2$ ) e concentração de ficocianina (30,67 mg.g<sup>-1</sup> biomassa seca) são satisfatórios e estão de acordo com a literatura.



## 5CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho atingiram os objetivos iniciais de produção, extração e recuperação de ficocianina da *Spirulina platensis* para aplicação em alimentos. Concluiu-se, em nosso estudo, que a concentração de ficocianina extraída e o crescimento celular estão associados, já que alcançaram valores de máximo de ficocianina ( $13,69 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca) e de concentração celular ( $0,42 \text{ g.L}^{-1}$ ), no último dia de cultivo avaliado (15º dia).

O método de extração em ciclos de congelamento/descongelamento foi o que obteve melhor e maior quantidade de pigmento igual a  $126 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, em relação ao *French press* que atingiu  $25,62 \text{ mg ficocianina.g}^{-1}$  biomassa seca em 580 atm e a homogeneização por pressão que alcançou  $22,92 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca em 400 atm. E ainda, constatou-se que o método de congelamento/descongelamento é menos agressivo, quando comparado com os outros dois métodos de ruptura celular, isto é, protege as enzimas e as organelas da microalga, sem deixar de ser eficiente.

Foi possível concluir também, com o processo de purificação por precipitação, que em baixas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ocorreu a precipitação de outras proteínas e com adição de mais solução saturada do sal aconteceu a precipitação de ficocianina como também de outros pigmentos. Sendo assim, a precipitação por fracionamento nas concentrações de 30% e 60% de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram escolhidas e forneceram ficocianina com maior taxa de pureza ( $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280} = 2$ ) e recuperação de  $30,67 \text{ mg.g}^{-1}$  biomassa seca, sendo que essa ficocianina, após dessalinização, pode ser utilizada pela indústria de alimentos.

## **6SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- 1) Estudar a influência da intensidade de luz nos cultivos de microalgas e biorreatores que minimizem essa limitação.
- 2) Estudar e avaliar a utilização de microalgas em tratamentos de resíduos industriais e agropecuários.
- 3) Avaliar a produção de biodiesel a partir de microalgas.
- 4) Analisar a estabilidade da ficocianina alterando parâmetros físico-químicos.
- 5) Ampliar a escala de produção, extração e purificação de modo a obter ficocianina para a indústria alimentícia.
- 6) Estudar as funções fisiológicas *in vivo* da ficobiliproteína.

## **REFERÊNCIAS**

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.

ALAVA, D.; MELLO, P. C.; WAGENER, K. The relevance of the CO<sub>2</sub> partial of pressure of sodium bicarbonate solutions for the mass cultivation of the Microalga *Spirulina*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 5, p. 447–450, 1997.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **J. Aquaculture**, AQUA 627417, 2006.

APT, K. E.; BEHRENS, P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **J. Phycol.**, v. 35, p. 215–226, 1999.

BECKER, W. **Microalgae in human and animal nutrition**. In: RICHMOND, A. (ed.) Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, 2004, p. 312-351.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. **Biomass**, v. 4, n. 2, p. 105-125, 1994.

BENEDETTI, S.; BENVENUTI, F.; PAGLIARANI, S.; FRANCOGLI, S.; SCOGGIO, S.; CANESTRI, F. Antioxidant properties of novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**, v. 75, p. 2353-2362, 2004.

BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.

BERGMAN, B.; GALLON, J. R.; RAI, A. N.; STAL, L. J. N<sub>2</sub> fixation by nonheterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 19, p. 139–185, 1997.

BERNS, D. S.; SCOTT, E. Protein Aggregation in a thermophilic protein. Phycocyanin from *Synechococcus lividus*. **Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 1528-1533, 1966.

BOROWITZKA, M. A. **Fats, oils and hydrocarbons**. Cambridge University Press, Cambridge, 1988, p. 257–287.

BOROWITZKA, M. A. **Vitamins and fine chemicals from microalgae**. Cambridge University Press, Cambridge, 1988, p. 153–196.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **J. Biotechnol.**, v. 70, p. 313–321, 1999.

BRASIL. ANVISA. **Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> 2008a. Acesso em: 11/03/2008.

BRASIL. ANVISA. **Resolução - CNNPA Nº 44, de 25 de novembro de 1977**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> 2008b. Acesso em: 11/03/08.

BROWN, M. R.; MULAR, M.; MILLER, I.; FARMER, C.; TRENERRY, C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 247–255, 1999.

CAO, J.; XU, Z.; QIU, G.; LI, B. Studies on the sensitivity of *Spirulina platensis* to antibiotics and herbicide: relationship with selectable markers for genetic transformation. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 89-93, 1999.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 221-224, 1997.

CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnol Lett**, v. 18, p. 603–8, 1996.

CHEN T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103-107 2006.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evolution of *Spirulina sp.* Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461-465, 2004.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/

water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 173, p. 181-192, 2000.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 1489-1493, 2007.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. Corantes alimentícios, **B.CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

CONTREAS-FLORES, C.; PENA-CASTRO J. M.; FLORES-COTERA, L. B.; CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. **INVERCIENCIA**. v. 28, n. 8, p. 450-456, 2003.

CONVERTI, C.; LODI, A.; BORGHI, A. D.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 13-18, 2006.

CORPO PERFEITO. Disponível em: <<http://www.corpoperfeito.com.br/subcategoria/?sb=espirulina>>. Acesso em: 04/01/2006.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRÜGER, R. T. Modeling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 16, p. 15-18, 2000.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. F. D. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 237-241, 2004.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 261 – 269, 2002.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 329-335, 2004.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. **Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina**, 2006.

DOWNHAM, A. e COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5-22, 2000.

EDWARDS, M. R.; MACCOLL, R.; EISELE, L. E. Some physical properties of an unusual C- phycocyanin isolated from a photosynthetic thermophile. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1276, p. 64–70, 1996.

EDWARDS, M. R.; HAUER, C.; STACK, R. F.; EISELE, L. E.; MACCOLL, R. Thermophilic C-phycocyanin: effect of temperature, monomer stability, and structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1321, p. 157-164, 1997.

EISELE, L. E.; BAKHRU, S. H.; LIU, X.; MACCOLL, R.; EDWARDS, M. R. Studies on C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium*, a eukaryote at the extremes of habitat. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1456, p. 99-107, 2000.

FELIPE M. A.; BERMEJO, R. Obtención de biliproteínas de interés biotecnológico industrial mediante cromatografía de adsorción em lecho expandido. **Iniciación a la Investigación**, revista electrónica, Universidade de Jaén, v. 17, 2006.

FUKUI, K.; SAITO, T.; NOGUCHI, Y.; KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A.; NISHIMURA, H.; INADA, Y. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. **Dyes and Pigments**, v. 63, p. 89-94, 2004.

FURTADO, M. **REVISTA QUÍMICA e DERIVADOS** - EDITORA QD. Disponível em <<http://www.quimica.com.br>> Acesso em: 25/07/2006.

FURUKI, T.; MAEDA, S.; IMAJO S.; HIROI, T.; AMAYA, T.; HIROKAWA, T.; ITO, K.; NOZAWA, H. Rapid and selective extraction oh phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 319-324, 2003.

GOLDMAN, J. C. Outdoor algal mass cultures:II. Photosynthetic yield limitations. **Algae Biomass**, v. 11, p. 119-135, 1980.

GÓMEZ-LOJERO, C.; PÉREZ- GÓMEZ, B.; PRADO-FLORES, G.; KROGMANN, D. W.; CÁRABEZ-TREJO, A.; PEÑA-DÍAZ, A. The Phycobilisomes of the Cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, p. 1191-1205, 1997.

HARDBODY NUTRITION. Disponível em <<http://www.hardbodynutrition.com>>. Acesso em: 25/07/2006.

HAYASHI, N. R.; TERAZONO K.; HASEGAWA. N.; KODAMA, T.; IGARASHI, Y. Identification and characterization of phycobiliprotein from a thermophilic cyanobacterium, *Chroococcidiopsis* sp strain TS-821. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 5, p. 475-477, 1997.

HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina**, 4 ed. 1997. Disponível em <<http://www.spirulina.com>>. Acesso em: 25/07/2006.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*- Superalimento del futuro. **Barcelona: Ediciones Urano S.A.** ISBN 84-7953-047-2, 1994.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417-423, 2005.

HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313-316, 1998.

HOEK, C.; MAN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University, 1995, 623p.

HOFFMANN. L. Criteria for the classification of blue-green algae at the genus and at the species level. **Archives of Hydrobiology / Algological Studies**, v. 50, p. 131-139, 1988.

JACOBSON, G.; WASILESKI, J. Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients. **New York: John Wiley e Sons**, 1994.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model f algal yield. **Aquaculture**, v. 221, p. 331-345, 2003.

LEE, YUAN-KUN Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 307-315, 2001.

LI, YE; WANG, BEI; AI, XI-CHENG; ZHANG, XING-KANG; ZHAO, JING-QUAN; JIANG, LI-JIN Spectroscopic investigation on the energy transfer process in photosynthetic apparatus of cyanobacteria. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, p. 1543-1547, 2004.

LIMA, E. C.; MASINI, J. C. Caracterização ácido-base da superfície de espécies mistas da alga *Spirulina* através de titulação potenciométrica e modelo de distribuição de sítios discretos. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 679-683, 1999.

LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. **Gayana Bot.**, v. 60, n. 2, p. 83-89, 2003.

LUMRY, R.; EYRING, H. Conformation changes of proteins. **J. Phys. Chem.**, v. 58, p. 110-120, 1954.

MADHYASTHA, H. K.; RADHA, K. S.; SUGIKI, M.; OMURA, S. MARUYAMA, M. Purification of c-phycocyanin from *Spirulina fusiformes* and its effect on the induction of urokinase-type plasminogen from calf pulmonary endothelial cells. **Phytomedicine**, 2005.

MÁRQUEZ-ROCHA, F. J. Reassessment of the bioenergetic yield of *Arthrospira platensis* using continuous culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 235-238, 1999.

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1357-1367, 2007.

METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Ind. Microbiol.** v. 17, p. 477-489, 1996.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSCHEVA, M. CH. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 55-59, 2003.



MORENO, J.; VARGAS, M. A.; RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 191-197, 2003.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ, J. A.; GÒDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 535-547, 2001.

MULITERNO, A.; MOSELE, P., C., COSTA, J., A., V., HEMKEMEIER, M., BERTOLIN, T., E., COLLA, L., M. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

NAKAMOTO, H.; HONMA, D. Interaction of a small heat shock protein with light-harvesting cyanobacterial phycocyanins under stress conditions. **FEBS Letters**, v. 580, p. 3029-3034, 2006.

NAVALHO, J. Biotecnologia de *Dunaliella salina* para a produção de beta-caroteno. **Dissertação (Mestrado em Aquicultura)** - Universidade do Algarve, Algarve, 1998.

NIU, JIAN-FENG; WANG, GUANG-CE; LIN, XIANG-ZHI; ZHOU, BAI-CHENG. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 267-276, 2007.

OGBONNA, JAMES C.; TANAKA, HIDEO Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 207-218, 2000.

OGBONNA, J. C.; YADA, H.; TANAKA, H. Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 3, p. 259-264, 1995.

OGBONNA, J. C.; YADA, H.; TANAKA, H. Effect of cell movement by random mixing between the surface and bottom of photobioreactors on algal productivity. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 152-157, 1995.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLAIZOLA, M. ; DUERR, E. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platenis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 97-104, 1990.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; ÂNGULO-GUERRERO, O.; HERNANDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.

OLVERA-RAMÍREZ, R.; CEDILO, M. C.; VILLANUEVA, R. O. C.; JERÓNIMO, F. M.; NOYOLA, T. P.; LEAL, E. R. Growth evolution and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 121-124 2000.

ONCEL, S.; SUKAN, F. V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource Technology**, 2007.

PÁDULA, M.; BOITEUX, S.; FELZENSZWALB, I.; MENEZES, S. Photodynamic action of phycocyanin: damage and repair. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, p. 19-26, 1996.

PATEL, A., MISHRA, S., PAWAR, R., GHOSH, P., K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248-255, 2005.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 76-81, 2006.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p.156-164, 2007.

PELIZER, I. H.; DANESI, E. D.; RANGEL, C. O.; SASSANO C. E. N.; CARVALHO J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.

PIÑERO ESTRADA, J. E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extrat. **IL Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 65, p. 635-648, 2004.

QIANG, HU; FAIMAN, D.; RICHMOND, A. Optimal tilt angels of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.2, p. 230-236, 1998.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v 92, p. 133-141, 2004.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**, 6a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906p.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n. 01, p. 23-28, 2006.

REINEHR, C. O. Estudo do cultivo semicontínuo de microalga *Spirulina platensis* utilizando água da lagoa Mangueira. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande**, Rio Grande, 2001.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 937-943, 2006.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; NOVAIS, J. M. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 181-187, 1998.

SÁNCHEZ-LUNA, L. D.; CONVERTI, A.; TONINI G. C.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v. 31, p. 297-245, 2004.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 17-21, 2003.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; NOYOLA, T. P.; RAMÍREZ, R. O; LÓPEZ, J. O; VILLANUEVA, O. C. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin form *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 795-801, 1999.

SCHLUCHTER, W., Ph.D. **Biochemistry, Microbiology, and Molecular Biology**, 1994. Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, Disponível em: < [http://www.biology.uno.edu/fac\\_web\\_pages/schlucterhtm.html](http://www.biology.uno.edu/fac_web_pages/schlucterhtm.html)>. Acesso em: 17/06/2008.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, S. J.; KELIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1629-1634, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SLOTH, J. K.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 198-175, 2006.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217–224, 2005.

SONI, B.; KALAWADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, Índia. **Process Biochemistry**, PRBI 7974, 2006.

SPIRULINA WORLD. **Suplemento Nutricional**: Comprimidos Spirulina. Disponível em: < [http://www.spirulinaworld.org/evolutionary\\_health.htm](http://www.spirulinaworld.org/evolutionary_health.htm)>. Acesso em: 25/07/2006.  
SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **J. Bioscience and Bioengineering**, v. 101, No. 2, p. 87-96, 2006.

SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 563-569, 2006.

SZALONTAI, B.; GOMBOS, Z.; CSIZMADIA, V.; BAGYINKA, L. M. Structure and interactions of phycocyanobilin chromophores in phycocyanin and allophycocyanin from an analysis of their resonance Raman spectra. **Biochemistry** v. 33, p. 11823–11832, 1994.

TCHERNOV, A. A.; MINKOVA, K. M.; HOUBAVENSKA, N. B.; KOVACHEVA, N. G. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by aminohexyl-sepharose chromatography. **Journal Biotechnology**, v. 69, p. 69-73, 1999.

TRAVIESO, L.; HALL, D. O.; RAO, K. K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 181-155, 2001.

TZOVENIS, I.; DE PAUW, N.; SORGELOOS, P. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. **Aquaculture**, v. 216, p. 203–222, 2003.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 263-271, 2003.

VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. **Biomass**, v. 2, p. 175–185, 1982.

WANG, C.-Y.; FU, C.-C.; LIU, Y.-C. Effects of using Light emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 21-25, 2007.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 487–502, 1997.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina máxima*. **Thesis (Ph.D) - Université Des Paris**, Paris, 1966.

ZENG, MING-TAO; VONZHAK, AVIGAD Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 120, p. 113-118, 1998.

ZHANG, X.-W.; ZHANG, Y.-M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 477-481, 1999.

## ANEXOS

ANEXO 1 - CURVA PADRÃO DA MICROALGA *SPIRULINA PLATENSIS* EM  
MEIO ZARROUK.....

ANEXO 2 - CURVAS DE ABSORBÂNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO..... 86

ANEXO 3 – CURVAS DE ABSORBÂNCIA DA PRECIPITAÇÃO COM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . 87

# ANEXO 1 - CURVA PADRÃO DA MICROALGA *SPIRULINA PLATENSIS* EM MEIO ZARROUK

- Cálculo da concentração celular

TABELA 1- MASSA DO FILTRO MILIPORE

Filtro nº	Sem biomassa (g)	Com biomassa seca (g)	Diferença (g)
1	0,0734	0,0753	0,0019
2	0,0736	0,0757	0,0021
3	0,0798	0,082	0,0022
4	0,0833	0,0859	0,0026
5	0,0733	0,0758	0,0025
6	0,0846	0,0871	0,0025
7	0,0738	0,0761	0,0023
8	0,0804	0,083	0,0026
9	0,0804	0,083	0,0026
10	0,0846	0,0877	0,0031

TABELA 2 - DILUIÇÕES E VOLUMES UTILIZADOS DA CULTURA DE *SPIRULINA PLATENSIS*

Tubo	Diluições	Diferença (g)	Volume (mL)
1	1:9	0,0019	60
2	2:8	0,0021	35
3	3:7	0,0022	25
4	4:6	0,0026	20
5	5:5	0,0025	15
6	6:4	0,0025	13
7	7:3	0,0023	11
8	8:2	0,0026	10
9	9:1	0,0026	9
10	10:0	0,0031	8

TABELA 3 - LEITURAS DE TRANSMITÂNCIA



Diluições	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)	Média T (%)
1:9	84,5	84,9	84,6	84,3	84,6
2:8	74,6	74	74,4	74,2	74,3
3:7	65	65,3	65	64,8	65,0
4:6	56,5	56,7	56,7	56	56,5
5:5	49,6	48,8	49,6	49,3	49,3
6:4	43,3	43,2	43,6	42,4	43,1
7:3	37,1	38,9	38,1	36,9	37,8
8:2	33	33,2	33,3	32,8	33,1
9:1	28,2	29,4	28,8	29,2	28,9
10:0	25	25,5	25	24,9	25,1

- **Absorbância = 2 - Log 10 (Média T%)**

TABELA 5 – VALORES DE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÃO CELULAR PARA CADA DILUIÇÃO

Diluições	Absorbância	Concentração celular (g.L <sup>-1</sup> )
1:9	0,072758	0,0317
2:8	0,1290112	0,0600
3:7	0,1869196	0,0880
4:6	0,2481438	0,1300
5:5	0,3069329	0,1667
6:4	0,3652709	0,1923
7:3	0,423083	0,2091
8:2	0,4805001	0,2600
9:1	0,5391022	0,2889
10:0	0,6003263	0,3875

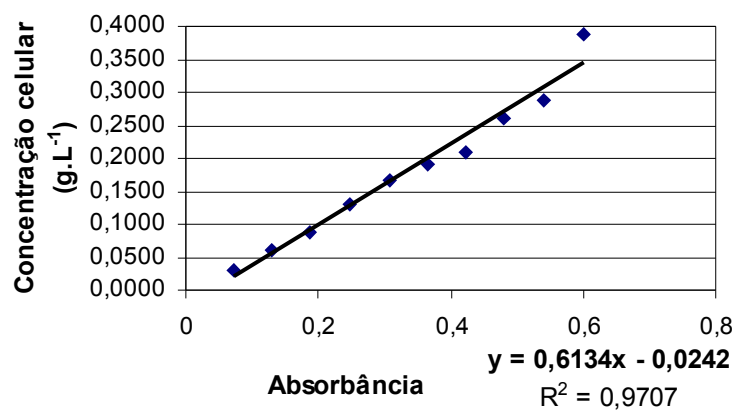


Figura 1 – Curva padrão da microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk.

## ANEXO 2 – CURVAS DE ABSORBÂNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

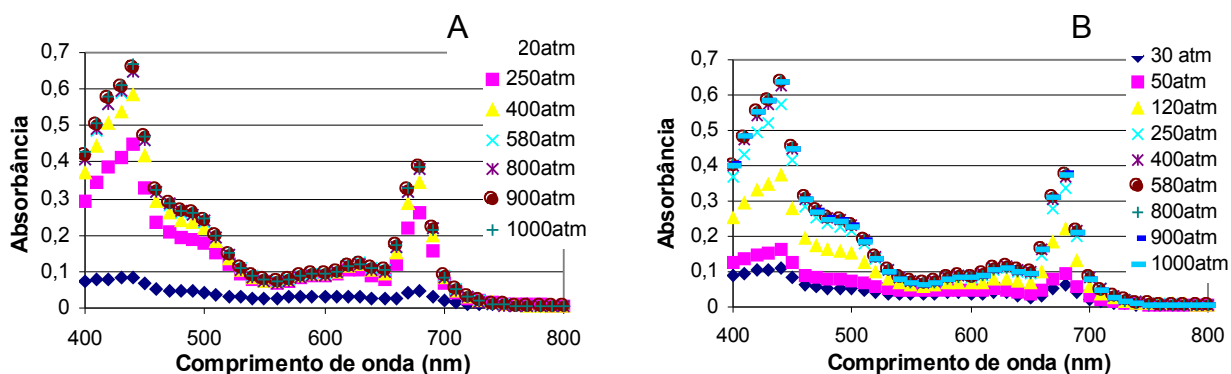


Figura 2 – Curvas de absorbância em diferentes pressões aplicadas em: A) *French press* e B) Homogeneizador de alta pressão.

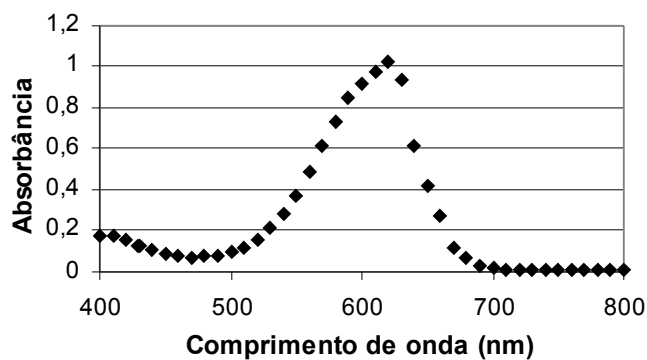


Figura 3 – Curva de absorbância do método de extração em ciclos de congelamento/descongelamento.

## ANEXO 3 – CURVAS DE ABSORBÂNCIA DA PRECIPITAÇÃO COM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

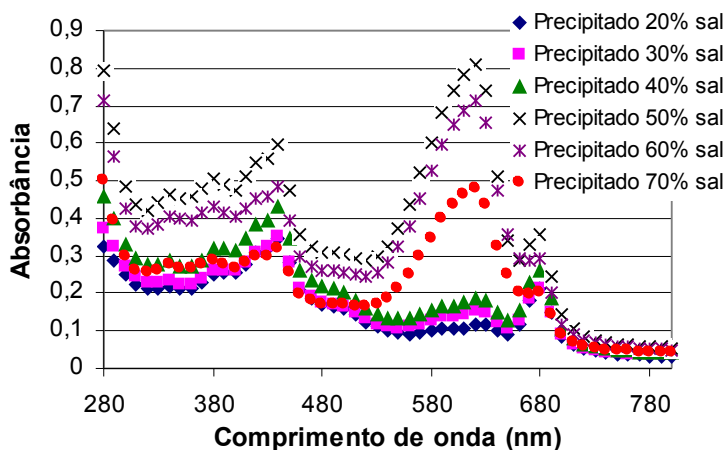


Figura 4 – Curvas de absorbância dos precipitados ressuspendidos em 20, 30, 40, 50, 60 e 70% de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

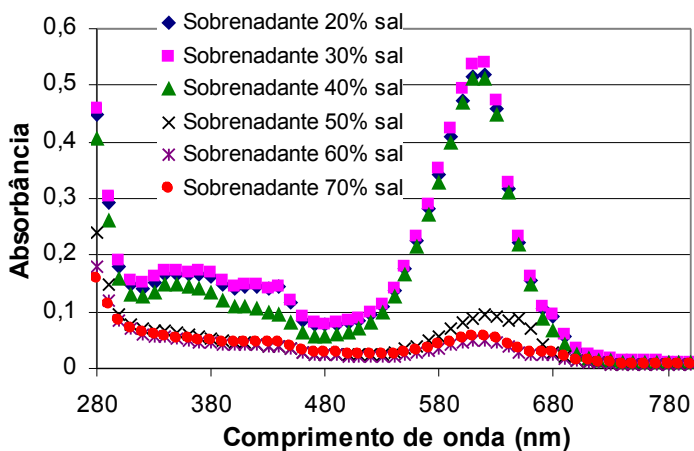


Figura 5 – Curvas de absorbância dos sobrenadantes em 20, 30, 40, 50, 60 e 70% de solução saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .